



HAL
open science

Analyse pronostique et transcriptomique de patients atteints de myélome multiple avec gain 1q

Lydia Montes

► **To cite this version:**

Lydia Montes. Analyse pronostique et transcriptomique de patients atteints de myélome multiple avec gain 1q. Hématologie. 2021. dumas-03448439

HAL Id: dumas-03448439

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03448439v1>

Submitted on 25 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020-2021

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Spécialité : Hématologie clinique et Thérapie cellulaire – Maladies du sang

**ANALYSE PRONOSTIQUE ET TRANSCRIPTOMIQUE DE PATIENTS
ATTEINTS DE MYELOME MULTIPLE AVEC GAIN 1q**

N° 2021-125

Présentée et soutenue publiquement le 23 Septembre 2021 par **Lydia Montes**

Jury :

Président du Jury : Monsieur le Professeur Jean Pierre Marolleau

Membres du Jury :

Monsieur le Professeur Bertrand Arnulf

Monsieur le Professeur Gabriel Choukroun

Monsieur le Professeur Loïc Garçon

Madame le Docteur Delphine Lebon

Madame le Docteur Jill Corre

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Pierre Morel

A mon Maître et Président de thèse,

Monsieur le Professeur Jean Pierre MAROLLEAU

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (Hématologie, transfusion)

Chef du service d'Hématologie clinique et de thérapie cellulaire

Chef du Pôle « Oncopôle »

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse

Merci pour votre sens clinique et votre pédagogie sans faille

Merci de nous pousser à toujours aller plus loin

Merci pour votre bienveillance

Soyez assuré de mon profond respect, de ma gratitude et de ma loyauté

A mon Maître et juge

Monsieur le Professeur Bertrand ARNULF

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

Chef du service d'Immuno-Hématologie au CHU de Saint-Louis, APHP

Merci de votre disponibilité et de votre humilité au quotidien

Merci pour votre pédagogie unique

J'espère garder au fil des années la même passion que vous pour notre métier

Soyez assuré de mon profond respect et de ma gratitude

A mon Maître et juge

Monsieur le Professeur Gabriel CHOUKROUN

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (Néphrologie)

Doyen, Directeur de l'Unité de Formation et de Recherche de Médecine d'AMIENS

Chef du service de Néphrologie, Médecine interne, Dialyse, Transplantation (Pôle D.R.I.M.E)

Vous me faites l'honneur d'être membre de mon jury de Thèse

Merci pour votre disponibilité et votre enseignement au cours de ces années

Soyez assuré de mon profond respect et de ma gratitude

A mon Maître et juge

Monsieur le Professeur Loïc GARCON

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier (Hématologie – Transfusion)

Chef du service d'Hématologie Biologique

Chef du service de Génétique Constitutionnelle

Vous me faites l'honneur d'être membre de mon jury de Thèse

Merci pour votre enseignement précieux

Soyez assuré de mon profond respect et de ma gratitude

A mon Maître et juge,

Madame le Docteur Jill CORRE

Maître de Conférence Universitaire – Praticien Hospitalier

Hématologie cellulaire et unité génomique du myélome

Institut Universitaire du Cancer de Toulouse – Centre de Recherche en Cancérologie de
Toulouse

Tu me fais l'honneur d'être membre de mon jury de Thèse

Merci pour ton aide et ton enseignement lors de cette escapade toulousaine

En espérant poursuivre notre collaboration dans le futur

A mon Maitre et juge, à mon amie,

Madame le Docteur Delphine LEBON

Praticien hospitalier – Hématologie clinique et thérapie cellulaire

Tu me fais l'honneur d'être membre de ma Thèse (sur du myélome)

Sans toi j'aurais fait droit au remords un fameux black Tuesday en 2^{ème} semestre

Merci pour ta pédagogie exceptionnelle et ta rigueur qui m'ont fait devenir ce que je suis

J'espère ne jamais te décevoir

A mon Directeur de Thèse,

Monsieur le Docteur Pierre MOREL

Praticien hospitalier – Hématologie clinique et thérapie cellulaire

Vous me faites l'honneur d'être mon Directeur de thèse,

Merci pour votre disponibilité constante et pour votre humilité remarquable,

Merci pour votre enseignement et pour vos idées inépuisables,

Puissé-je acquérir le quart de votre talent

Je dédie aussi ce travail..

A **ma mère**, mon manager, pour être là les bons jours comme les mauvais, et pour ton soutien indéfectible. A mon **père**, parce qu'il était fier.

A **mon frère**, à **Titis**, qui inconsciemment me donnent la force de vaincre.

A **mes grands-parents**, pour m'avoir transmis le goût de l'apprentissage et de la science.

A ma syster, **Babou**, on a tout fait ensemble depuis le lycée.. quel objectif maintenant ? la retraite ! Merci pour ces petits déjeuners où on refait le monde. Pour toujours.

A ma syster de Calella, **Elo**, pour tout ce qu'on partage et pour être toujours là quand j'ai besoin (d'autant tes capacités récentes en psychologie). Je suis tellement heureuse qu'on ait réussi à maintenir ce lien malgré la distance. Para siempre.

A **Jessica**, je n'oublierai jamais le jour de nos résultats de P1. Pour tous ces moments partagés ensemble depuis plus de 10ans ! T'es ma polak de cœur. Yakchemach !

A **Meriem**, la meilleure de mes externes, ma tchiote. Viens opérer les hémorroïdes des allogreffés amiénois !

A la Team de l'externat, **Marion, Laure, Pierre**, pur tous ces moments de rire (spécialement au ski) et pour votre aide pendant les révisions. J'ai tenu grâce à vous.

A la Team des bolossettes, **Ivonich et Mathildouille**, nous les poilues de la guerre balance-hyperdébit stomial. La preuve que dans l'adversité, mieux vaut se serrer les coudes. Je n'aurais pas pu rêver meilleures que vous pendant ce semestre.

A **Souad**, merci de m'avoir nourrie quand je rentrais à 23h de Lille en Twingo (paix à son âme).

A mes **co-internes**, pour votre sympathie et pour votre entraide. Jamais eu de mesquinerie entre nous et c'est assez rare pour être souligné. Mention spéciale à **Audrey Dararocha**, best co-interne ever. Quand tu veux pour refaire des déménagements où je ne sers à rien mais où on m'offre à manger. Mention spéciale à **Kazou Candou**, tu resteras mon interne référente quand j'étais un petit Bambi effrayé. Mention spéciale à **Agathe**, d'avoir fait de moi ton élève d'échographie cardiaque. Excellent. Mention spéciale à **Julie Carré** comme un carré, 2COMHEMOS forever. F10.

A **Maheo, Laura Bourriquet, Baddy, Laure, Céline, Julien, Léa et à toute l'équipe de l'UGM-CRCT Toulouse**. Merci pour votre accueil et pour tous ces moments. Je n'aurais jamais survécu à ce climat tropical sans vous. Mention spéciale à **tata Sab**, ingénieur chef aux commandes. J'espère avoir validé mon option nettoyage de frigos.

Au **Professeur Hervé Avet-Loiseau** pour votre aide précieuse dans ce travail et pour votre accueil. Pour votre disponibilité.

Aux médecins actuels et passés du service, **Caroline, Magalie, Lavinia, Matthieu, Amandine, Anne, Etienne, Deborah, Marie, Bruno, Bérengère**. Merci pour votre enseignement et votre patience. Mention spéciale à **Alexis**, je dis souvent que j'ai fait Hémato à cause de toi. J'espère être digne de tout ce que tu m'as apporté petite. Hâte de faire de grandes choses avec vous dans ce service qui m'est cher. Sans oublier nos amis bios, **Profesor Toto, Mailys, Veronique et Eric**.

A **Charline, Laurence, Seddick, Sandrine, Sandra, Lucie, Aurélie Catoire** et toute l'équipe d'infirmiers / infirmières, aides soignant(e)s, ASH du service. Merci pour votre bienveillance à mes débuts d'internes, pour ce que vous m'avez appris au quotidien et pour votre sympathie.

A **Pépette, Florence, Isabelle, Nathalie, Marine, Sophie et Jenna**. Merci pour votre sympathie et pour votre aide au quotidien. Mention spéciale pour **Pépette**, notre mère à tous. Emmène-moi dans ton camping-car !

A **Audrey, Amandine, Marine, Nadia, Laurine et Kim**. Merci de nous aider avec ces amendements de protocole. Merci pour votre sympathie et de rire à mes blagues.

A **Maman Sandrine, Jiji, Nathalie, Tata Sylvia, Mathilde, Cloclo, Mumu** et à toute l'équipe de la **MIPI-diabéto** ! Vous nous avez appris la vie en 1^{er} semestre. Bien plus qu'un service, on était une famille. On ne vous oubliera jamais.

A toute l'équipe de M4 : **Aminata, Bruno, Stéphanie, Camille, Alizée, Margaux**, et toute la team et à mes co-internes parisiennes **Mélanie, Marie, Nina, Caroline**. Paris c'est moche, l'APHP c'est compliqué, la gare du Nord fut mon quartier. Mais pour vous, je résignerai.

A **mon Pan-pan**, 'Donne-moi la force de supporter ce qui ne peut être changé; le courage de changer ce qui peut l'être; et la sagesse de distinguer l'un de l'autre' ; 'Se reposer est nécessaire, glandouiller est un art' ; 'Je nous construirai des moments, comme des morceaux d'éternité'...

Sommaire :

Introduction :	16
Matériel et Méthodes	22
Analyse Bio-informatique :	26
Analyse Statistique :	26
Résultats	27
<i>A. Analyse observationnelle</i>	27
1. Description de la population et analyse globale	27
2. Analyse de la survie sans progression	28
3. Analyse de la survie globale	29
<i>B. Analyse transcriptomique</i>	31
1. Analyse cytogénétique et moléculaire du gain 1q	31
2. Analyse moléculaire entre les patients porteurs d'une amplification 1q (4 copies) et d'un gain 1q (3 copies)	37
Discussion :	39
Conclusion :	44
Bibliographie :	45

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BCL 2/9	B Cell Lymphoma 2/9
BCMA	B Cell Maturation Antigen
BCR	B Cell Receptor
CAR-T cells	Chimeric Antigen Receptor T cells
CDKN2D	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2D
CKS1B	Cycline Kinase Sub-unit 1B
CNV	Copy Number Variation
DLBCL	Diffuse large B cell Lymphoma
DUSP8	Dual Specificity Phosphatase 8
EMP3	Epithelial Membrane protein 3
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FISH	Fluorescent In situ Hybridization
GEP	Gene Expression Profiling
ICAM	Interactions of cell adhesion molecule
IFM	Institut Francophone du Myélome
IGH	Immunoglobuline Heavy chain
IMWG	International Myeloma Working Group
IP3R	inositol 1,4,5-triphosphate Receptor
(R)ISS	(Revised) International Staging System
LDH	Lactate DesHydrogénase
MCL1	Myeloid Cell Leukemia 1
MDR1	Multi drug resistance 1
MM	Myélome multiple
MMSET	Multiple Myeloma Set domain
MTX	Methaxine
NBPF	Neuroblastoma Breakpoint Family
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NFKB	Nuclear Factor kappa B
NGS	Next Generation Sequencing
NTRK1	Neurotrophin Tyrosin Receptor Kinase 1

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORAI 1	calcium release-activated calcium channel protein 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMCA	Plasma membrane calcium transporting
PSMD4	Proteasome 26S Subunit non ATPase 4
R-CHOP	Rituximab Cyclophosphamide Doxorubicine Vincristine Prednisone
RIN	RNA Integrity Number
SERCA	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calciumATPase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSP	Survie sans progression
STIM1	calcium sensor stromal interaction molecule 1
TAGLN2	Transg�line 2
TAM	Tumor Associated Macrophages
TNM	Tumor Node Metastasis
TRP	Transient receptor potential
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VGCC	Voltage-gated calcium channel

Abstract :

Objective : gain 1q has unfavourable prognosis un multiple myeloma. The aim of this study is to compare global survival of patients with gain 1q and amplification 1q (more than 3 copies). We performed RNA-sequencing analysis to appreciate molecular pathway indeed.

Patients and Methods : We performed a retrospective statistical analysis of 219 patients cohort composed by 180 gain 1q and 39 amplification. Patients were homogeneously treated : immunomodulators or alkylating agent +/- proteasome inhibitor and steroids, with intensification and stem cell transplantation. Median follow up was 44 months. RNA-sequencing was performed on 24 gain 1q samples, 22 amplification 1q samples and 14 with no gain.

Results : Progression free survival showed no significant difference between gain 1q and amplification. Amplification 1q showed worst overall survival : 33,4 % versus 48,5% at 60 months, $p=0,051$ (HR = 1,49 [0,99 ; 2,23]). RNA-sequencing showed upregulation of *CKS1B*, *TAGLN2* and *NTRK1* in gain 1q. Genes coding for calcium binding protein and transport like S100 family proteins seems involved in pathological amplification 1q.

Conclusion : Amplification 1q seems to have worst prognosis on overall survival than gain 1q. Cellular cycle genes may be involved, as calcium transport genes.

Key Words : Multiple myeloma – gain 1q – CKS1B – calcium binding – S100

Introduction :

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne, décrite d'après les critères diagnostiques de l'International Myeloma Working Group (2014), comme une prolifération clonale, de plasmocytes anormaux, au sein de la moelle osseuse. Le plasmocyte est un lymphocyte B différencié mature pouvant acquérir deux fonctions principales : la sécrétion d'immunoglobulines (anticorps) et la formation de plasmocytes mémoires. Ces deux entités sont essentielles à la réponse immunitaire dite adaptative.

La moyenne d'âge des patients atteints de MM est de 65 ans et concerne préférentiellement les hommes avec un ratio de 3/2. L'incidence moyenne est de 6/100 000 habitants/an en France soit environ 4000-5000 nouveaux patients/an selon l'institut national de veille sanitaire. Le myélome multiple représente 1% de l'ensemble des cancers et 10-15 % des hémopathies malignes (1).

Le MM est décrit comme une maladie chronique, pour le moment incurable, mais dont les avancées médicales permettent d'obtenir des rémissions de plus ou moins long terme avec une amélioration de la qualité de vie et de la survie globale (3ans en 2005 contre 10ans de nos jours). De très nets progrès ont été obtenus ces vingt dernières années avec l'arrivée des inhibiteurs du protéasome (Bortézomib, Carfilzomib, Ixazomib), des immunomodulateurs (Thalidomide, Lénalidomide et Pomalidomide) et de l'immunothérapie tels que les anti-CD 38 (Daratumumab, Isatuximab) ou les anti-BCMA par exemple. Si bien que, cette quadruplette (+ corticoïdes) représente le traitement standard et recommandé en 1^{ère} ligne chez les patients éligibles à une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (Daratumumab-Velcade-Thalidomide-Dexaméthasone)(2,3). Les CAR-T cells (chimeric antigen receptor cells) représentent une voie d'avenir dans le myélome multiple également dans des premiers essais conduits chez des patients multitraités et de haut risque (4,5).

Malgré tout, nous observons une différence de réponse au traitement entre les patients et notamment une survie globale pouvant varier de moins de 2ans à plus de dix ans sans différence clinique pouvant l'expliquer. Des critères clinico-biologiques ont été mis en avant comme facteurs prédictifs de réponse : l'âge (meilleure réponse chez les moins de 70ans), le score OMS décrivant le degré d'altération de l'état général, le taux de β 2-microglobuline (plus mauvais pronostic si élevé), l'albumine (6). Puis, la cytogénétique prit une part prépondérante dans l'édification de facteurs pronostiques et la classification des patients (7). Le caryotype conventionnel permet de distinguer les anomalies de nombre chromosomiques (Copy Number

Variation - CNV) en décrivant les additions et délétions (caryotypes hyper/hypodiploïdes). Néanmoins, le faible index mitotique des plasmocytes rend cette technique peu informative. Par la suite, la technique de fluorescence in situ avec hybridation (FISH) permet de préciser les CNV et les translocations inter-chromosomiques dont notamment celles impliquant le locus des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) (Figure 1). Par la suite, se développa la technique du Single Nucleotide Polymorphism-array (SNP-array) qui continua d'affiner le diagnostic cytogénétique des patients. Le séquençage génomique de nouvelle génération (NGS) marqua un coup d'accélération dans l'analyse des profils mutationnels et moléculaires dans des domaines les plus variés, allant de la cancérologie à la cardiologie et pathologies métaboliques. L'analyse de tout le patrimoine génétique (Whole Genome Sequencing) à tout ce qui est transcrit (RNA-sequencing), à tout ce qui est codé (Whole Exome Sequencing) et traduit (Analyse Protéomique) devient possible et apporte de nombreuses réponses, mais aussi son lot de questionnements.

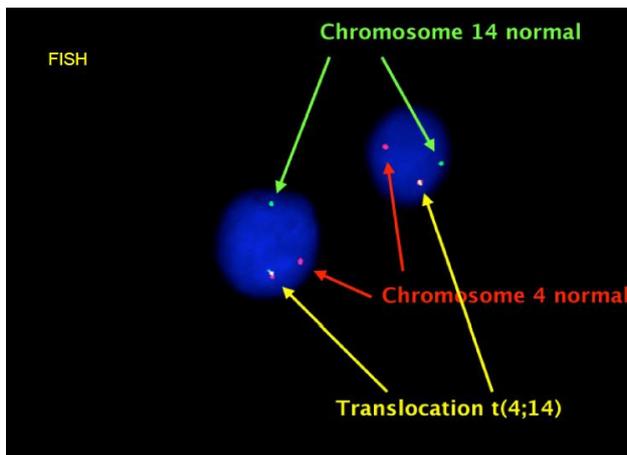


Figure 1 : Illustration d'une translocation (4 ; 14) en FISH. La sonde fluorescente verte représente le chromosome 14 présent en 2 exemplaires par cellule. La sonde fluorescente rouge représente le chromosome 4 (2 exemplaires par cellule). Le signal jaune représente la juxtaposition d'une verte et d'une rouge, soit d'une translocation (4 ; 14).

Le MM fait partie des pathologies cancéreuses les plus explorées et décrites sur le plan génomique. De nombreuses anomalies cytogénétiques et moléculaires sont recensées et impliquées dans la myélomagénèse. Les principales anomalies cytogénétiques connues impliquent le locus IGH sur le bras long du chromosome 14, au rôle déterminant dans la formation et la sélection des plasmocytes au sein du centre germinatif ganglionnaire. Les translocations placent un oncogène proche du locus IGH, qui 'profite' de sa forte activité transcriptionnelle pour être surexprimé. Les plus représentées sont la translocation (11;14)

(q13 ; q32) causant une surexpression de la cycline D1 (15-20% des patients), la translocation (4;14) (p16 ; q32) impliquant les gènes FGFR3/MMSET (10-15% de la population), la translocation (6;14) (p21 ; q32) impliquant la cycline D3 (3%), la t(14 ;16)(q23;q32) impliquant le gène MAF (2%) et la t(14 ;20) (q11;q32) (1%). Ces variants cytogénétiques sont pourvoyeurs d'un pronostic défavorable hormis la t(11 ;14) associée à un risque standard (8). La délétion 17p (ou la mutation du gène) impliquant le gène suppresseur de tumeur *TP53* est décrite dans de nombreuses néoplasies et apporte un pronostic défavorable, particulièrement marqué dans le MM (8% de la population). D'autres anomalies péjoratives sont recensées comme la trisomie 21 (également décrite dans la leucémie aigüe lymphoïde), la délétion 1p32, la délétion 13q, l'hypodiploïdie ou le gain 1q. Des variants cytogénétiques au rôle 'protecteur' existent : l'hyperdiploïdie (48 à 75 chromosomes), en particulier la trisomie 5. Des associations sont fréquentes entre ces anomalies comme par exemple : l'association entre délétion 13q, gain 1q et t(4 ;14) (9).

La classification pronostique des patients atteints de myélome au diagnostic comportait 2 items biologiques : le taux d'albumine et le taux de β 2-microglobuline, faciles d'accès et reproductibles par tous les centres. Depuis 2015 et le travail de l'IMWG (7), la cytogénétique est entrée de manière officielle et consensuelle dans les critères de classification pronostiques avec le score R-ISS (Revised International Staging System) (Figure 2).

Facteurs pronostiques	Critères
Score ISS	
I	Albumine ≥ 35 g/l et beta-2-microglobuline $\leq 3,5$ mg/l
II	Pas de critères I ou III
III	beta-2-microglobuline $\geq 5,5$ mg/l
Caryotype sur FISH	
Haut risque	Présence de <u>del(17p)</u> et/ou translocation t(4;14) et/ou translocation t(14;16)
Risque standard	Pas d'anomalies ci-dessus
LDH	
Normales	Inférieures à la valeur seuil
Élevées	Supérieures à la valeur seuil
R-ISS	
I	ISS =I et FISH risque standard et LDH normales
II	Pas de critères I ou III
III	ISS=III et : FISH haut risque ou LDH élevées

Figure 2 : Score pronostiques clinico-biologiques : International staging system (ISS) et Revised-International staging system (R-ISS). LDH = Lactate DesHydrogénase

Avec les avancées du NGS, A. Perrot, J. Corre et H. Avet-Loiseau ont construit un score pronostique pondéré purement cytogénétique (score PI), qui permet une prise en compte plus large des anomalies cytogénétiques et notamment l'intégration de facteurs protecteurs comme la trisomie 5 (10). Des questions demeurent quant aux gènes impliqués dans la myélomagénèse, aux voies métaboliques empruntées et au processus physiopathologique.

Le chromosome 1 est le plus grand chromosome humain avec plus de 200 millions de paires de bases. Il porte 8% du patrimoine génétique et est relié à plus de 350 pathologies différentes. Les plus recensées sont les pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson, les pathologies métaboliques telle que la maladie de Gaucher, et les pathologies cancéreuses, dont particulièrement les neuroblastomes dûs à la présence de nombreux gènes du groupe *NBPF* (Neuroblastoma Breakpoint Family) sur le locus 1q21 (11).

Le gain du chromosome 1q concerne 35-40% des patients atteints de myélome au diagnostic, (8) deuxième anomalie caryotypique la plus fréquente après la délétion 13q (55%)(12). Le locus 21 sur le chromosome 1q, communément appelé 'hotspot', du fait de la localisation de nombreux gènes d'intérêt en cancérologie, est la cible de nombreuses recherches. Ont été évoqués les gènes codant pour *MCL1* (Myeloid Leukemia Cell Differentiation protein) (13,14) et *BCL9* (B Cell Lymphoma 9 protein) (15) appartenant à la superfamille des gènes anti-apoptotiques, *PSMD4* (Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 4) (9) jouant un rôle dans la dégradation protéasomique. Le gène *CKS1B* (Cycline Kinase Sub-unit 1B) localisé en position 1q21.3, est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire en s'associant au complexe d'ubiquitine-ligase SCFskp2, qui agit dans la dégradation de la protéine p27 (16). P27 est une protéine inhibitrice de kinase qui régule négativement le cycle cellulaire. Les taux de *CKS1B* et de P27 sont souvent inversement proportionnels dans les affections malignes et la régulation à la baisse de p27 a été associée à une agressivité clinique et à un mauvais pronostic dans diverses tumeurs : cancer du nasopharynx, cancer du sein, tumeur de Wilms chez l'enfant ou encore dans la forme blastoïde du lymphome du manteau. (17–21). Son implication dans le myélome multiple a été suggérée principalement dans l'étude de Shaughnessy et al (22), où le profil d'expression génique (expression relative de gènes par rapport à un ADN de référence, sous forme de fluorescence) retrouvait 70 gènes pronostiques, dont 30% localisés sur le chromosome 1. De plus, les études utilisant la quantification de l'ARN par q-PCR ou de la protéine de *CKS1b* par western blot (16,23), décrivent une augmentation de la protéine (et donc de son activité) en fonction du nombre de copies du chromosome 1q. En effet, les patients peuvent être porteurs de 3 jusqu'à 8 copies de la portion longue du chromosome 1. Les avis divergent quant au réel impact pronostique de l'amplification 1q (4copies).

Le calcium [Ca²⁺], principal cation extracellulaire et messager ubiquitaire de multiples voies de signalisation, apparaît comme un acteur essentiel à la cancérogenèse via son implication dans le cycle cellulaire, la prolifération, la résistance à l'apoptose (24,25). De plus, la machinerie oncogénique apparaît comme sensible aux mécanismes de régulation du calcium. L'homéostasie calcique dépend de canaux transporteurs/pompes, essentiels à la régulation du flux calcique entre les secteurs intra et extra-cellulaire. On peut citer les échangeurs responsables de l'influx calcique (vers le secteur intra-cellulaire) : les *Voltage-gated calcium channel* (VGCC) qui sont des composants aux propriétés électrochimiques. Le niveau entre la concentration de calcium intra-cytosolique et extra-cellulaire varie entre 100nM et 1mM, ce qui crée un gradient de concentration favorable au transfert intra-cellulaire. Les *Transient receptor potential* (TRP) représentent une famille de canaux avec une haute sensibilité pour le calcium. Un autre transporteur calcique responsable du transfert vers l'intra-cellulaire a été étudié : *calcium release-activated calcium channel protein 1* (ORAI1). Ce dernier est activé par le relargage des stocks calciques du réticulum endoplasmique par STIM1 (*calcium sensor stromal interaction molecule 1*), ce qui montre la forte communication au sein de la cellule. A l'inverse, certains transporteurs et pompes calciques gèrent l'efflux : les *Plasma membrane calcium transporting ATPase* (PMCA), le récepteur inositol 1,4,5-triphosphate (IP3R) et les SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calciumATPase*) (26–29). Ces différents acteurs de l'homéostasie calcique ont été décrits comme modifiés, surtout en cancérologie solide : TRPM8 a été rapporté comme surexprimé dans le cancer de la prostate, TRPV6 surtout exprimé dans le cancer du sein ne comportant pas de récepteur aux oestrogènes (ER), à l'inverse certains transporteurs peuvent être sous-exprimés comme PMCA4 dans le cancer du côlon ((30)) par exemple. En 2018, Wang et al décrivaient une surexpression de STIM1 et ORAI1 dans le myélome multiple, en comparaison à des patients sains. L'expression de la protéine sur les fragments de moelle était corrélée à une surexpression de l'ARN messager en RT-PCR. Sur les données rétrospectives cliniques, ils retrouvaient une association significative entre l'expression des transporteurs calciques et le pronostic des patients : sur le stade ISS et sur la survie sans progression. En utilisant des méthodes de *Silencing* de l'ARN d'ORAI1 et STIM1, ils démontraient une diminution de la viabilité cellulaire et confirmaient le lien étroit entre la myéломagenèse et le métabolisme calcique (31). La famille S100 regroupe 25 gènes uniquement présents chez les vertébrés, codant pour des protéines 'calcium-binding', donc au rôle de fixation du calcium et de transport calcique. 19 de ces gènes sont localisés sur le hotspot 1q21. Le terme S100 tient son origine de la solubilité des protéines dans 100% de sulfate d'ammonium saturé. Ce sont principalement des homodimères symétriques, dont chaque sous unité comporte 4 hélices α . Elles dégagent une poche hydrophobique qui se liera à leur cible

physiologique, entraînant une affinité pour le calcium 5 à 300 fois plus forte qu'à l'état basal (32,33).

Connaissant le rôle essentiel du calcium dans la signalisation cellulaire, on peut comprendre qu'il soit détourné et modifié par la machinerie oncogénique. Le transport calcique et les modifications de concentration intra-cellulaire peuvent activer ou inactiver des voies du métabolisme cellulaire telles que *NFkB*, *NFAT*, *ERK*, ainsi que des facteurs de transcription impliqués dans le cycle cellulaire : *FOS*, *JUN* et *MYC*. Le calcium a été aussi décrit comme potentiel inducteur de la mobilité cellulaire et de l'angiogénèse, facilitant la prolifération et l'invasion métastatique (28). La mort cellulaire est aussi altérée avec notamment une étroite interférence entre le métabolisme calcique et les membres de la famille *BCL2*, protéines pro et anti-apoptotiques souvent responsables d'une survie cellulaire dans de nombreux cancers solides et liquides (30). Les mécanismes de survie dépendent également des éléments et apports extérieurs à la cellule cancéreuse, plus largement décrit comme le micro-environnement tumoral. Le calcium est un élément clé du microenvironnement tumoral, en interagissant avec divers éléments comme les fibroblastes, les macrophages associés à la tumeur (TAM), les chimiokines (CCL18) jouant un rôle dans l'invasion cellulaire et les voies de l'inflammation (IL6, TNF α ..) (30,32,34).

Le but de notre étude est d'utiliser les outils modernes de l'analyse transcriptomique pour dégager un profil moléculaire en lien avec le gain 1q et responsable de son impact pronostique péjoratif. Nous tenterons de répondre à d'autres questions : y a-t-il une différence pronostique entre les patients porteurs de 3 copies contre 4 copies ? des différences moléculaires ? Une analyse observationnelle de cohorte nous permettra d'analyser le pronostic du gain (3copies) contre l'amplification (>3copies). Le RNA-sequencing nous aidera à répondre aux questions physiopathologiques.

Matériel et Méthodes

Population de l'étude : 219 patients ont été inclus dans l'étude, diagnostiqués entre 2007 et 2014 selon les critères diagnostiques de l'IMWG (35) tous traités de manière homogène (immunomodulateurs ou alkylants +/- inhibiteurs du protéasome, corticoïdes), incluant une intensification thérapeutique avec autogreffe de cellules souches hématopoïétiques, suivis depuis au moins 5ans et porteurs de copies supplémentaires du 1q. Les échantillons furent collectés au moment du diagnostic et avant initiation du traitement, dans tous les centres hospitaliers participant à l'Intergroupe Francophone du Myélome (IFM) et acheminés au centre de recherche en cancérologie de Toulouse. Tous les patients signèrent un consentement éclairé et l'étude fut approuvée par le comité d'éthique de Toulouse.

La médiane d'âge était de 58 ans : 54% d'hommes et 46% de femmes. Des données supplémentaires sont disponibles dans les tableaux 1 et 2. La répartition des patients selon le score pronostique PI décrit 3 catégories de patients : 76,7% de patients 'intermediate risk' ; 23,4% de patients 'high risk' ; 0% de patients 'low risk' (10). La médiane de score PI entre les patients porteurs d'un gain ou d'une amplification 1q est équivalente à 0.8. La médiane de suivi était de 44 mois.

A la réception des échantillons de moelle osseuse, un tri plasmocytaire permet d'enrichir la population CD138+ via MAC-Sorting (Myltenyi Biotec, Paris, France). La pureté cellulaire requise est supérieure à 90% (analyse microscopique après coloration au May Grünwald Giemsa). Une congélation des cellules triées est réalisée en RLT+ (tampon de lyse qui stabilise les acides nucléiques) pour extraction de l'ARN.

Une première analyse cytogénétique par FISH et par SNP-array (Affymetrix, Santa Clara, CA) est réalisée permettant d'établir les principales anomalies cytogénétiques. 64 échantillons ont été utilisés pour la préparation de bibliothèques RNA-seq, 60 séquencés (4 bibliothèques exclues pour qualité médiocre). La cohorte comportait : 24 patients porteurs de 3copies de 1q, 22 patients porteurs de 4copies de 1q et 14 patients 'contrôles' sans gain 1q.

Extraction ARN avec le kit Allprep DNA/RNA/miRNA Qiagen : L'extraction d'ARN est réalisée à partir d'échantillons conservés dans du RLT+. L'extraction comprenait une étape de digestion de l'ADN sur colonne (DNase). Le contrôle qualité comporte une analyse quantitative via Trinean (mesure de la concentration d'ARN et du ratio de contaminants protéiques A260/A280) et une analyse qualitative via Tape station (qualité de migration

électrophorétique). 64 échantillons ont été sélectionnés avec un seuil de RNA Integrity Number (RIN) supérieur à 8, et une quantité d'ARN de 550ng.

Préparation des bibliothèques avec le kit TruSeq Stranded mRNA Library Prep Illumina :

- 1) Capture et Fragmentation de l'ARN messager : on utilise des billes magnétiques associées à des oligo-T complémentaires afin de capturer les ARN messagers flanqués d'une queue poly-A (adénylée). S'en suit une étape de fragmentation de l'ARN par des cations divalents et épreuve calorimétrique. Incorporation de séquences 'primers' aux extrémités (en violet sur le schéma) pour amorcer la synthèse de l'ADN complémentaire.

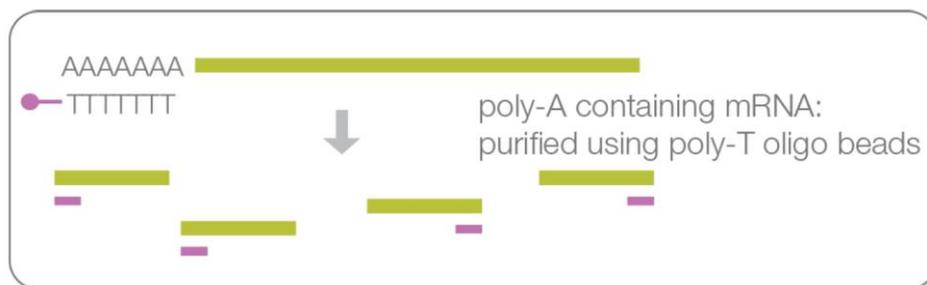


Figure 3 : Capture, Fragmentation de l'ARNm, incorporation d'amorces aléatoires.

- 2) Synthèse de l'ADN complémentaire monobrin : synthèse de l'ADNc par transcription inverse des fragments d'ARNm au moyen d'amorces aléatoires
Ajout d'Actinomycine, agent intercalant, qui va empêcher la transcription et détruire l'ADN contaminant.



Figure4 : Synthèse de l'ADN complémentaire monobrin

- 3) Synthèse du 2^{ème} brin d'ADN complémentaire : synthèse du 2^{ème} brin par une DNA polymérase. Incorporation de nucléotides Uracile à la place de la Thymine sur le second brin, empêchant son amplification. Phosphorylation des extrémités 5'

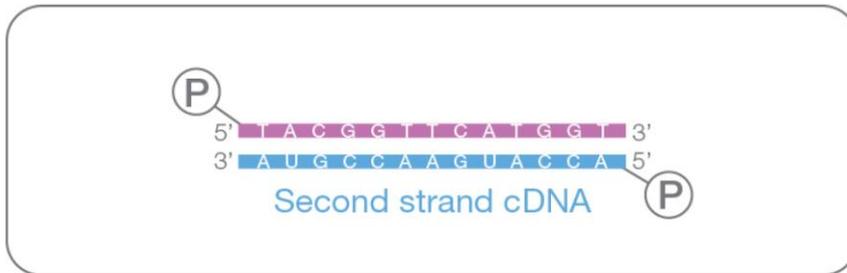


Figure 5 : synthèse du 2^{ème} brin d'ADNc

- 4) Adénylation des extrémités 3' et ligation des adaptateurs : Ajout d'un nucléotide A (Adénine) aux extrémités 3' des fragments obtenus afin d'orienter le sens de la ligation. Ligation d'adaptateurs portant des index spécifiques (rectangles noirs sur le schéma) sur les extrémités adénylées de chaque échantillon. Le double indexage de chaque échantillon permet un multiplexage étendu et une analyse d'un plus grand nombre d'échantillons.

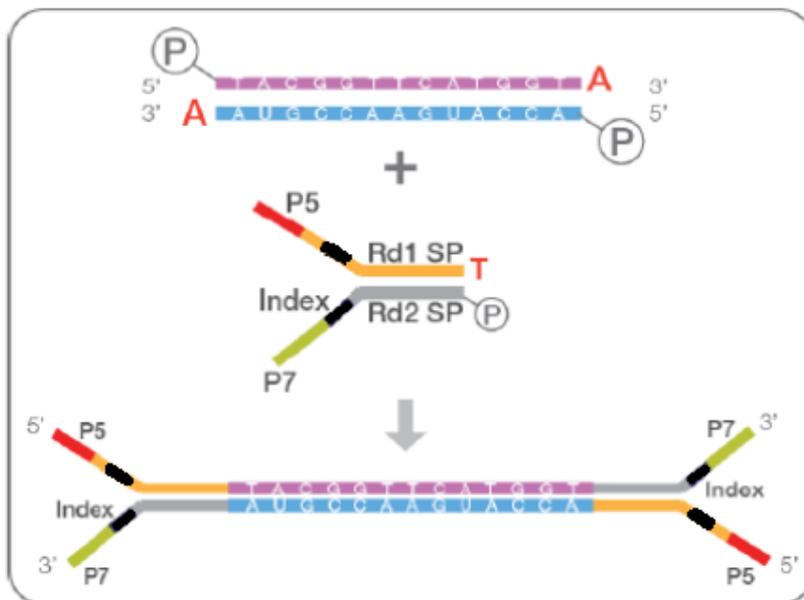


Figure 6 : Adénylation et ligation des adaptateurs

- 5) Amplification de l'ADN : Synthèse et amplification de l'ADN complémentaire par PCR. Extinction du second brin d'ADN à la reconnaissance des nucléotides Uracile.

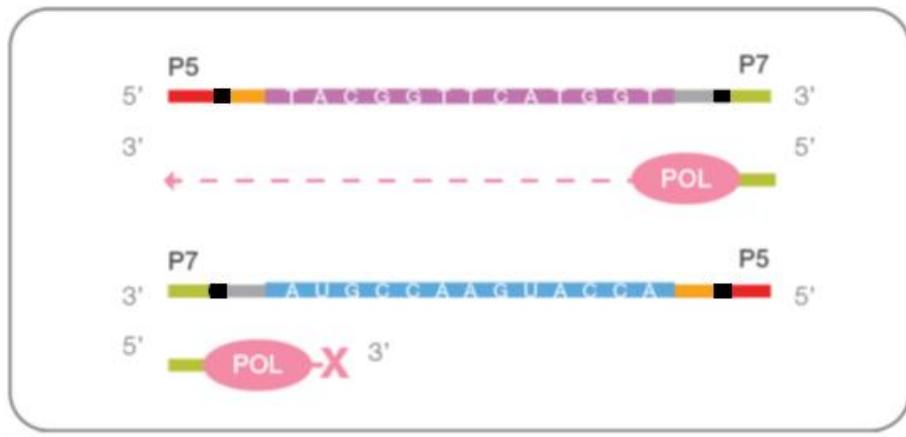


Figure7 : Amplification de l'ADN par polymerase.

- 6) Contrôle qualité : visualisation de la qualité de migration de l'ADN complémentaire sur TapeStation avec utilisation du kit Bioanalyzer High Sensitivity (DNA analysis kit, Agilent, CA). Objectif ciblé de 300paires de bases.
Quantification de la concentration de chaque librairie par q-PCR.
- 7) Librairie finale : Constitution d'un pool final de librairies, de concentration normalisée pour obtenir un nombre de séquences de lectures équivalent entre chaque échantillon.
- 8) Séquençage sur NextSeq 500 en 2x75 bases avec kit Nextseq500 High Output kit v2 (150cycles) : une première étape de clusterisation permet de fixer et d'amplifier les librairies sur la flowcell via leur extrémité P7. Ensuite le séquençage se fait de façon séquentielle.

Analyse Bio-informatique :

Les données de séquençage ont été alignées contre le transcriptome humain, basé sur le génome Grch38 version 87, par le logiciel *STAR* 2.4.2a.

Ces données ont été traitées par la librairie *DESeq2* version R 1.22.2 permettant l'analyse d'expression différentielle en utilisant la loi binomiale négative.

Les échantillons ont d'abord été visualisés grâce à une analyse à composantes principales afin de mettre en valeur la potentielle séparation des groupes selon leur profil transcriptomique.

Ensuite chaque analyse d'expression différentielle entre deux groupes a pu être représentée sous forme de volcano plot. Celui-ci, mettant en évidence les gènes significativement exprimés (p ajustée < 0.05) différant entre les groupes. Un seuil a été choisi arbitrairement pour déterminer les gènes surexprimés (FoldChange > 2) et sous exprimés (FoldChange $< 0,5$).

Ces seuils fixés, les données des gènes significativement sous et sur exprimés ont été utilisées pour identifier les voies métaboliques empruntées. Cette méthode d'analyse d'enrichissement a été exécutée grâce à la librairie *fgsea* version 1.8.0 sous R permettant une analyse rapide et statistique avec un correction sur tests multiples.

Les gènes ont été analysés contre les différentes collections de voies métaboliques annotées de la base de données *Molecular Signatures Database v6.2* du Broad Institute.

Analyse Statistique :

Nous avons recueilli de manière rétrospective, les données cliniques pour les 219 patients inclus dans l'analyse observationnelle, incluant la première rechute permettant de calculer la survie sans progression (temps défini entre la date du diagnostic et la date de rechute) et la date de décès ou de dernières nouvelles permettant de calculer la survie globale (temps défini entre la date du diagnostic et la date de décès / date de dernières nouvelles). Les courbes de survie ont été décrites selon la méthode de Kaplan-Meier et estimation de la valeur p via le test Mantel-Cox Log-rank, en utilisant les logiciels statistiques Prism5 et R.

Résultats

A. Analyse observationnelle

1. Description de la population et analyse globale

Tableau 1 : Descriptif de la cohorte

	Total N = 219	nb copies lq 3 N = 180	4 N = 39	
Age au diagnostic (Y) (n = 219)				
Median	58.0	58.0	59.0	
(Range)	(37.0: 76.0)	(37.0: 76.0)	(41.0: 66.0)	
Age au diagnostic (cl) (n = 219)				p = 0.6269
<60 ans	120 (54.8%)	100 (55.6%)	20 (51.3%)	
>=60 ans	99 (45.2%)	80 (44.4%)	19 (48.7%)	
Sexe (n = 219)				p = 0.7744
Homme	119 (54.3%)	97 (53.9%)	22 (56.4%)	
Femme	100 (45.7%)	83 (46.1%)	17 (43.6%)	
ISS (n = 191)				p = 0.6995
1	39 (20.4%)	34 (21.5%)	5 (15.2%)	
2	90 (47.1%)	73 (46.2%)	17 (51.5%)	
3	62 (32.5%)	51 (32.3%)	11 (33.3%)	
Missing	28	22	6	
Type de traitement (n = 219)				p = 0.7388
Triplette				
imid-PI-dex-auto	99 (45.2%)	82 (45.6%)	17 (43.6%)	
VCD-auto	12 (5.5%)	9 (5.0%)	3 (7.7%)	
VD-auto	108 (49.3%)	89 (49.4%)	19 (48.7%)	
del(17p) (n = 219)				p = 0.0285
Non	199 (90.9%)	160 (88.9%)	39 (100.0%)	
Oui	20 (9.1%)	20 (11.1%)	0 (0.0%)	
t(4;14) (n = 214)				p = 0.0002
Non	143 (66.8%)	128 (72.3%)	15 (40.5%)	
Oui	71 (33.2%)	49 (27.7%)	22 (59.5%)	
Missing	5	3	2	
Trisomie 5 (n = 219)				p = 0.0444
Non	150 (68.5%)	118 (65.6%)	32 (82.1%)	
Oui	69 (31.5%)	62 (34.4%)	7 (17.9%)	
Trisomie 21 (n = 218)				p = 0.5977
Non	178 (81.7%)	145 (81.0%)	33 (84.6%)	
Oui	40 (18.3%)	34 (19.0%)	6 (15.4%)	
Missing	1	1	0	
Del(1p32) (n = 219)				p = 0.0480
Non	185 (84.5%)	148 (82.2%)	37 (94.9%)	
Oui	34 (15.5%)	32 (17.8%)	2 (5.1%)	

On remarque une proportion supérieure de t(4 ;14) dans notre cohorte par rapport aux chiffres de la population globale. Ceci en accord avec la littérature qui associe qui décrit une forte

association entre le gain 1q et la translocation (4 ;14). Le débat sur l'impact pronostique indépendant du gain 1q ou lié à son association avec t(4 ;14) est réactualisé avec ces résultats.

L'étude de la cohorte globale met en avant une survie sans progression de 20,6 mois et de survie globale de 48,8 mois, des chiffres nettement inférieurs à ceux de la population globale atteinte de myélome et éligible à la greffe (124mois de survie globale en moyenne) (1)

2. Analyse de la survie sans progression

On ne montre pas de différence significative sur la survie sans progression entre les patients porteurs d'un gain 1q en comparaison aux patients porteurs d'une amplification 1q avec respectivement une survie à 24 mois de 45,8% et 30,7% (HR = 1,39 [0,97 ; 1,99]) (figure 11 et tableau 2).

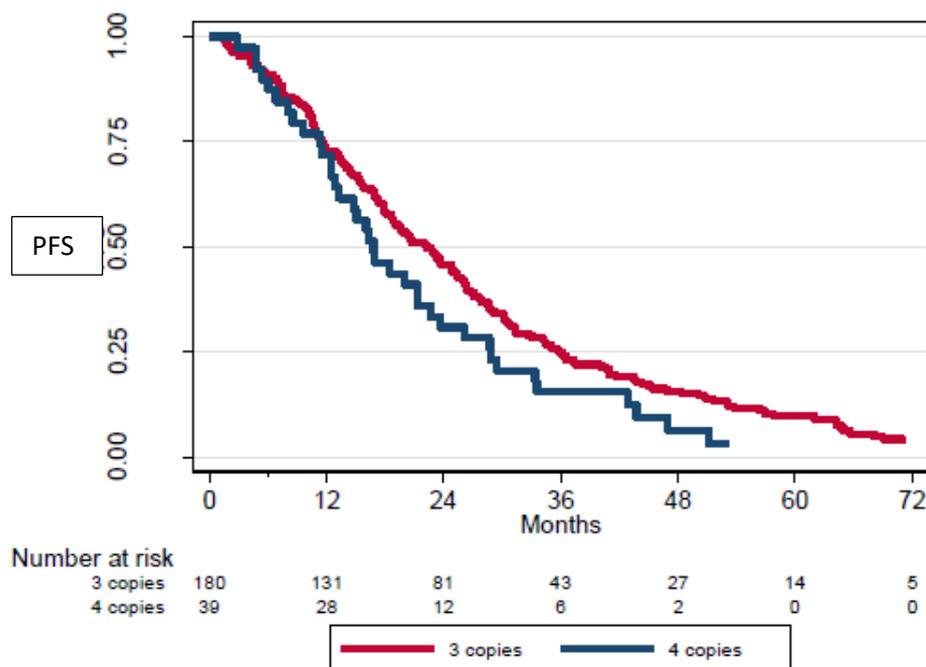


Figure 8 : Survie sans progression : comparaison entre 3 copies et 4 copies du chromosome 1q.

L'analyse univariée retrouve comme seul facteur significatif l'existence d'une délétion 1p32, avec une survie sans progression à 2 ans de 32,5 % parmi les patients portant la délétion (tableau 2).

Tableau 2 : Analyse univariée de la survie sans progression

		Evt/ N	Surv (t= 24)	HR	IC95%	
Sexe :	Homme	116 / 119	40.34%	1.00		p = 0.5347
	Femme	94 / 100	46.49%	0.92 [0.70; 1.21]		
ISS :	1	37 / 39	45.57%	1.00		p = 0.6617
	2	86 / 90	43.33%	1.04 [0.71; 1.54]		
	3	59 / 62	36.35%	1.19 [0.78; 1.80]		
Age au diagnostic (cl) :	<60 ans	115 / 120	39.62%	1.00		p = 0.9231
	>=60 ans	95 / 99	47.38%	1.01 [0.77; 1.33]		
del(17p) :	Non	190 / 199	43.95%	1.00		p = 0.1549
	Oui	20 / 20	35.00%	1.40 [0.88; 2.22]		
t(4;14) :	Non	136 / 143	45.81%	1.00		p = 0.1355
	Oui	70 / 71	36.62%	1.25 [0.93; 1.67]		
Del(1p32) :	Non	176 / 185	45.12%	1.00		p = 0.0440
	Oui	34 / 34	32.35%	1.46 [1.01; 2.11]		
Trisomie 5 :	Non	143 / 150	39.24%	1.00		p = 0.6872
	Oui	67 / 69	51.66%	1.06 [0.79; 1.43]		
nb copies lq :	3	173 / 180	45.85%	1.00		p = 0.0727
	4	37 / 39	30.77%	1.39 [0.97; 1.99]		

3. Analyse de la survie globale

Les résultats de médiane de survie marquent une différence en faveur du groupe 3 copies par rapport au groupe 4 copies : 48,5% et 33,4 % respectivement à 60 mois (HR = 1,49 [0,99 ; 2,23]), cependant non significative (p=0,051) (figure 12).

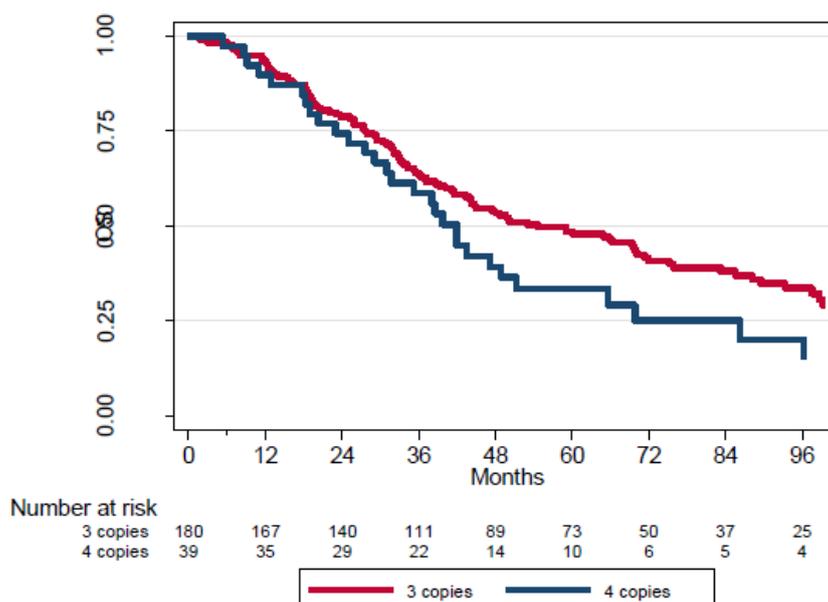


Figure 9 : Survie globale : comparaison entre 3 copies et 4 copies du chromosome 1q.

Tableau 3 : Analyse univariée de la survie globale

		Evt/ N	Surv(t= 60)	HR	IC95%	
Sexe :	Homme	79 / 119	46.71%	1.00		p = 0.5083
	Femme	63 / 100	44.96%	0.89 [0.64; 1.25]		
ISS :	1	20 / 39	65.27%	1.00		p = 0.0384
	2	59 / 90	43.16%	1.62 [0.97; 2.69]		
	3	44 / 62	39.68%	1.98 [1.16; 3.36]		
Age au diagnostic (cl) :	<60 ans	78 / 120	44.71%	1.00		p = 0.5799
	>=60 ans	64 / 99	47.40%	0.91 [0.65; 1.27]		
del(17p) :	Non	123 / 199	48.63%	1.00		p = 0.0020
	Oui	19 / 20	20.00%	2.11 [1.30; 3.43]		
t(4;14) :	Non	86 / 143	47.82%	1.00		p = 0.0865
	Oui	54 / 71	41.59%	1.35 [0.96; 1.89]		
Del(1p32) :	Non	117 / 185	48.50%	1.00		p = 0.0156
	Oui	25 / 34	30.73%	1.70 [1.10; 2.63]		
Trisomie 5 :	Non	98 / 150	43.59%	1.00		p = 0.3423
	Oui	44 / 69	50.70%	0.84 [0.59; 1.20]		
nb copies 1q :	3	112 / 180	48.56%	1.00		p = 0.0516
	4	30 / 39	33.45%	1.49 [0.99; 2.23]		

L'ISS, la délétion 17p et la délétion 1p32 ressortent comme des variables significatives péjoratives (Tableau 3). A noter que la translocation (4 ; 14) ne ressort pas comme facteur indépendant pronostique de la survie globale. Le nombre de copies 1q tend à être significatif (HR = 1,49 [0,99 ; 2,23]). Il est probable que le manque de puissance pronostique soit dû au faible effectif dans le sous-groupe de patients porteurs de 4copies.

L'analyse multivariée confère à la del17p, la del1p32, la trisomie 21 et à l'amplification 1q une valeur pronostique péjorative dans la survie globale de notre cohorte (Tableau 4).

Tableau 4 : Analyse multivariée de la survie globale

OS n=187 (122 décès)	Modèle de départ	
Variable	HR [CI 95%]	p
ISS (ref 1)		
• 2	1.36 [0.80 ; 2.81]	0.260
• 3	1.68 [0.96 ; 2.92]	0.069
d17p	1.87 [1.05 ; 3.33]	0.033
t(4 ;14)	1.17 [0.76 ; 1.80]	0.479
1p32	1.87 [1.14 ; 3.07]	0.013
t5	0.81 [0.53 ; 1.25]	0.343
t21	2.21 [1.44 ; 3.41]	<0.001
4 copies (vs 3)	1.66 [1.02; 2.72]	0.043

B. Analyse transcriptomique

1. Analyse cytogénétique et moléculaire du gain1q

a) Analyse de la composante principale : observation des 3 sous-groupes

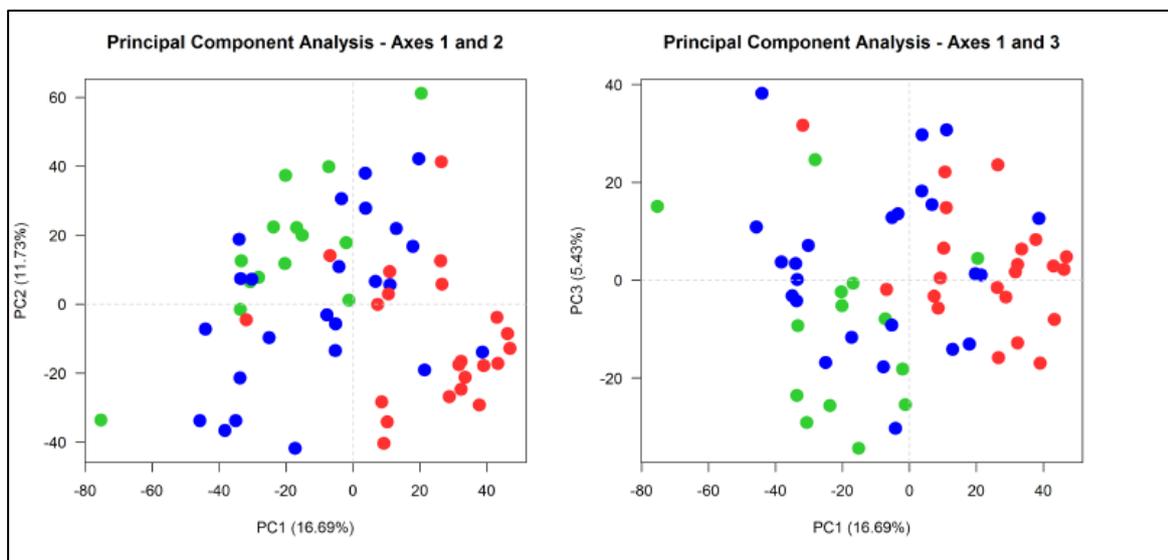


Figure 10 : Représentation de l'analyse composante principale : observation de 3 clusters différents.

2 copies du gène 1q : vert

3 copies du gène 1q : bleu

4 copies du gène 1q : rouge

Cette représentation en heatmap permet d'apprécier visuellement les niveaux d'expression génique entre les 3 groupes de patients. Le groupe des 4 copies exprimant des gènes communs aux deux autres groupes est également représenté. Le cluster des 2 copies (vert) présente des gènes surexprimés dans la partie haute de la heatmap (au-dessus de la ligne horizontale) et sous-exprimés dans la partie basse. A l'inverse, des patients issus des groupes 3 et 4 copies forment un 2^{ème} cluster d'expression génique : sous-expression dans la partie haute, surexpression dans la partie basse. Tout à droite se dégage un 3^{ème} cluster de patients issus des groupes 3 et 4 copies, sur-exprimant de manière majoritaire ses gènes. Cette image nous permet de conclure à une différence significative d'expression génique entre les patients 2 copies et les patients porteurs d'un gain 1q.

c) Volcano plot : expression des gènes d'intérêt : 3 copies par rapport à 2 copies du 1q

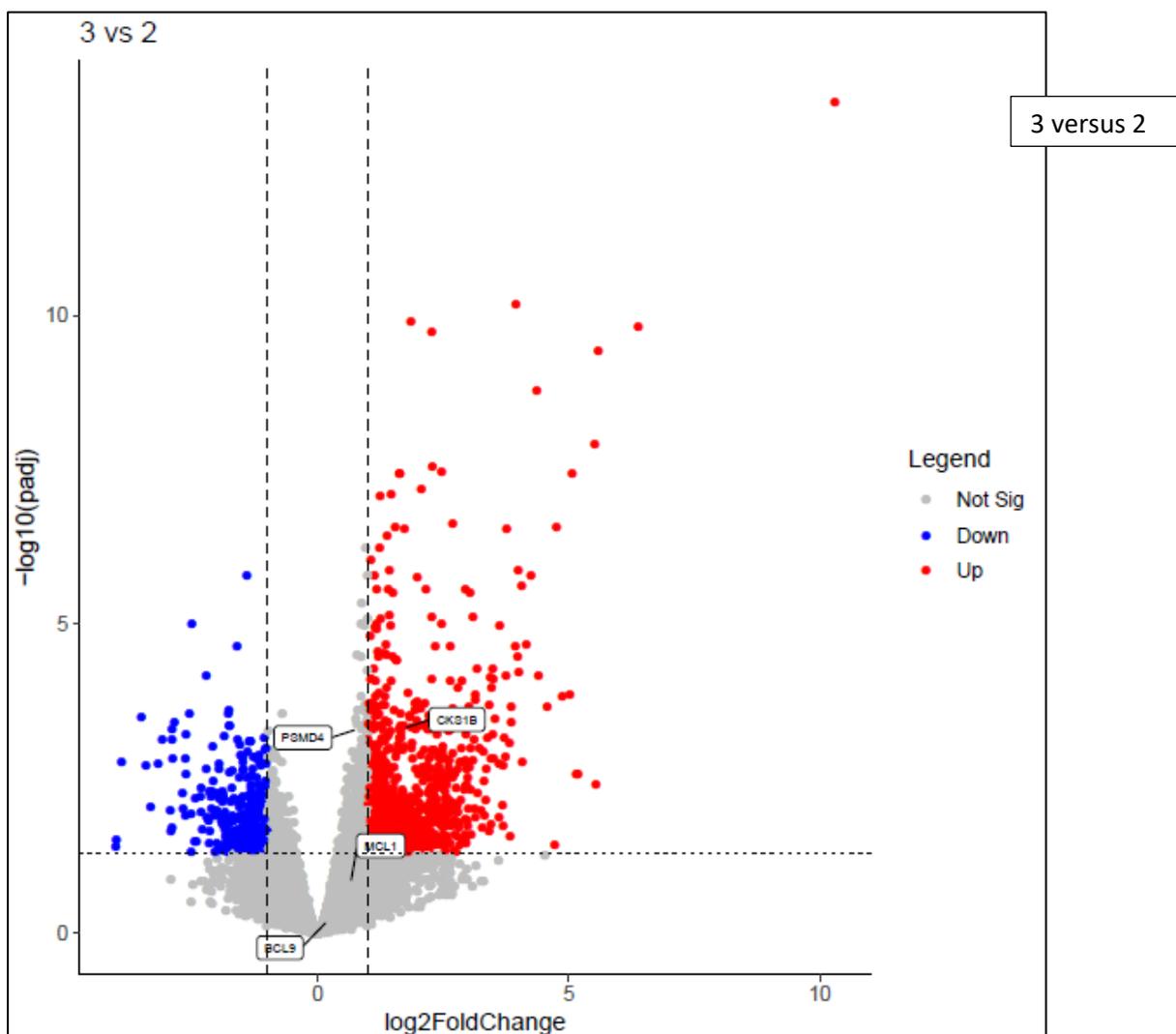


Figure 12 : Volcano plot représentant les gènes significativement surexprimés et sous-exprimés chez le groupe 3 copies par rapport au groupe 2 copies. En rouge les gènes surexprimés, en bleu les sous-exprimés, en gris les non significatifs. Localisation des gènes *CKS1B*, *PSMD4*, *MCL1* et *BCL9*.

Le volcano plot nous permet de représenter de manière différente, les niveaux d'expression génique entre les 2 groupes. Notre attention s'est portée particulièrement sur les 4gènes précédemment cités dans les études sur le chromosome 1q : *CKS1B*, *PSMD4*, *MCL1* et *BCL9*. Dans notre cohorte, seul *CKS1B* ressort significativement surexprimé parmi le groupe 3 copies par rapport au groupe 2 copies. Ce résultat est concordant avec les précédentes études incriminant *CKS1B* dans la physiopathologie de cette population.

d) Volcano plot : Top 10 des gènes surexprimés : groupe 3 copies comparé au groupe 2 copies.

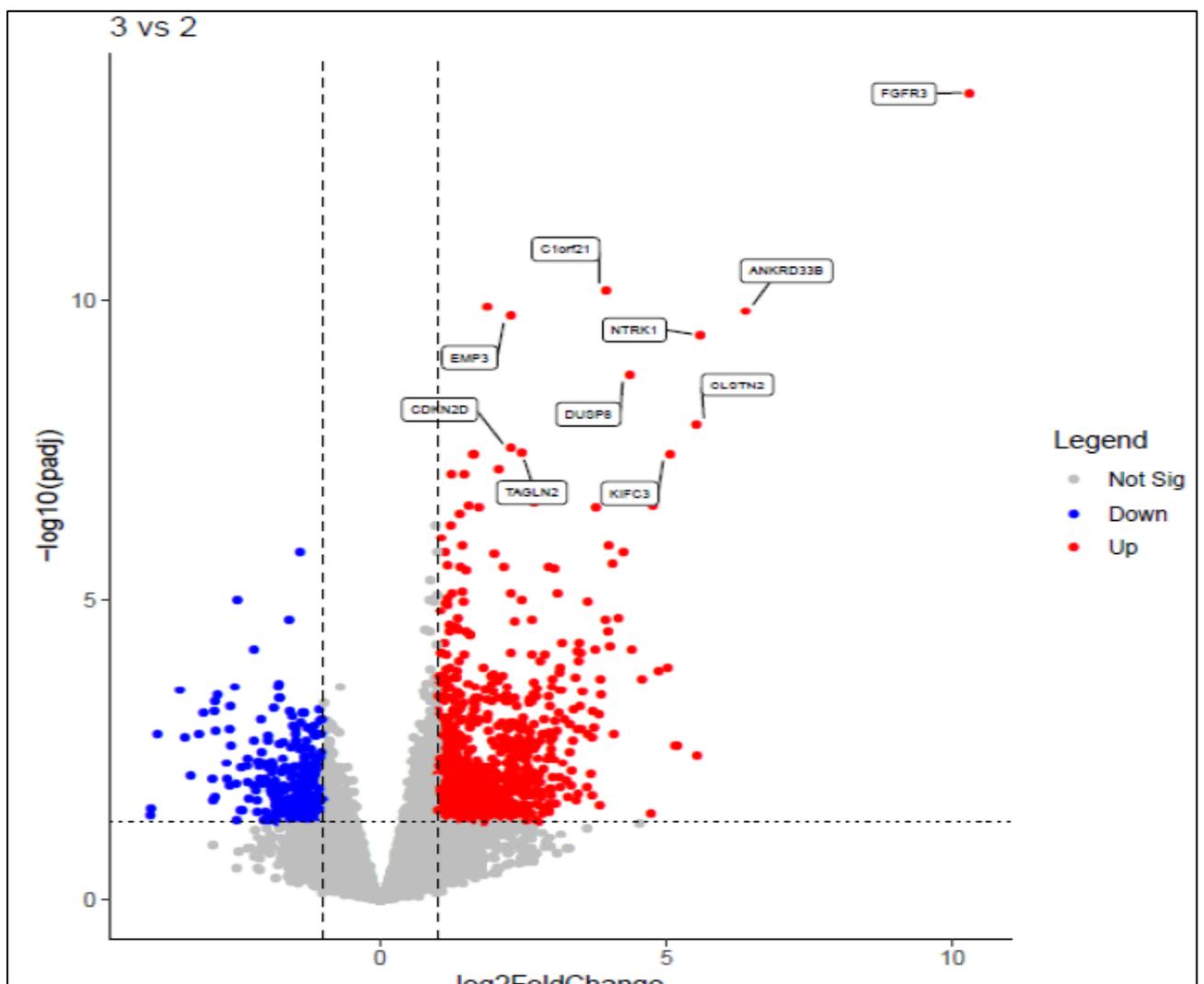


Figure 13 : Volcano plot représentant les 10 gènes les plus surexprimés (nombre de fold change) et le plus significativement (p adj) par le groupe 3copies par rapport aux 2copies.

Cette image représente les 10 gènes significativement les plus exprimés par le groupe 3 copies par rapport au groupe 2 copies. Nous pouvons citer les gènes *DUSP8* (Dual specificity phosphatase 8) localisé sur le chromosome 11, qui joue un rôle dans le cycle cellulaire en inhibant la voie MAP Kinase (36); le gène *EMP3* (Epithelial Membrane protein 3 - chromosome 19) qui est associé à la prolifération cellulaire et à la communication intercellulaire. *EMP3* a été évoqué comme gène suppresseur de tumeur dont la dérégulation épigénétique est en cause dans le carcinome hépatocellulaire ou le glioblastome (37) *FGFR3* (Fibroblast growth factor receptor 3) est surexprimé, probablement en rapport avec la forte association du gain 1q avec la translocation (4 ; 14). On remarque que *CKS1B* ne fait pas partie des 10 gènes les plus surexprimés significativement par le groupe 3copies.

Plus particulièrement, les gènes *NTRK1* et *TAGLN2*, localisés sur le locus 1q21.3, représentent une piste de recherche intéressante. En effet le premier est connu dans les leucémies aigües lymphoïdes de l'enfant ou encore dans le glioblastome pour être impliqué dans des transcrits de fusion oncogéniques (38,39). Le second code pour une protéine de la famille des 'Actin-binding protein', protéine de liaison à l'actine dans les fibres musculaires, mais avec aussi un rôle oncogénique, étudié dans le glioblastome (40,41).

Etonnamment, est surexprimé *CDKN2D* (cyclin dependant kinase inhibitor 2D), gène localisé sur le chromosome 19p13, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, et impacté dans certaines maladies neurodégénératives.

2. Analyse moléculaire entre les patients porteurs d'une amplification 1q (4 copies) et d'un gain 1q (3 copies)

a) Heatmap : Niveau d'expression génique global comparant les groupes 4 à 3 copies de 1q

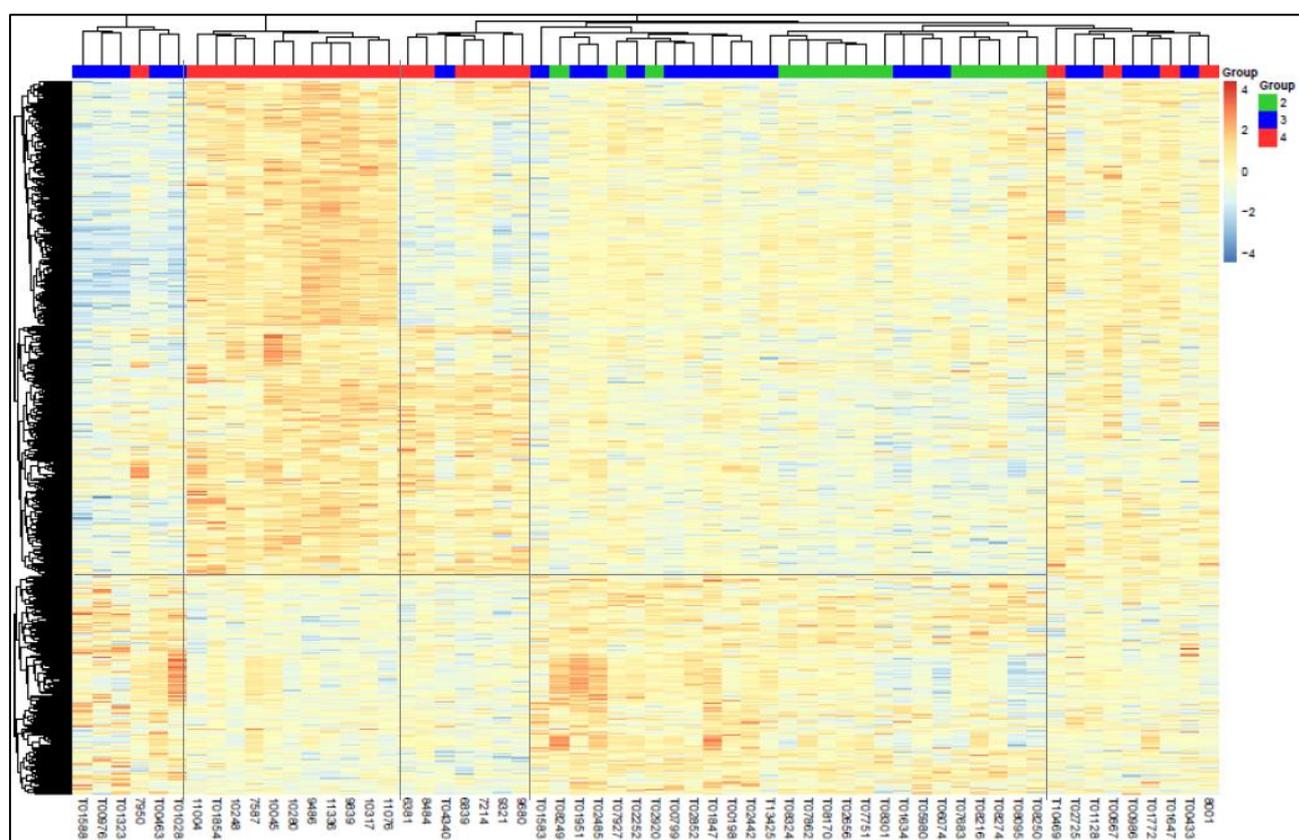


Figure 15 : Heatmap : expression globale des gènes entre les groupes 4 et 3

On observe une différence d'expression nette entre le groupe des 4 copies (en rouge) par rapport au groupe des 3 copies (à gauche et au centre du heatmap). A l'extrémité droite, persiste un groupe d'échantillons 3 et 4 copies dont les gènes sont globalement tous surexprimés.

b) Heatmap : représentation du niveau d'expression génique comparant les groupes 4 et 3 copies, sur les gènes localisés sur le chromosome 1q.

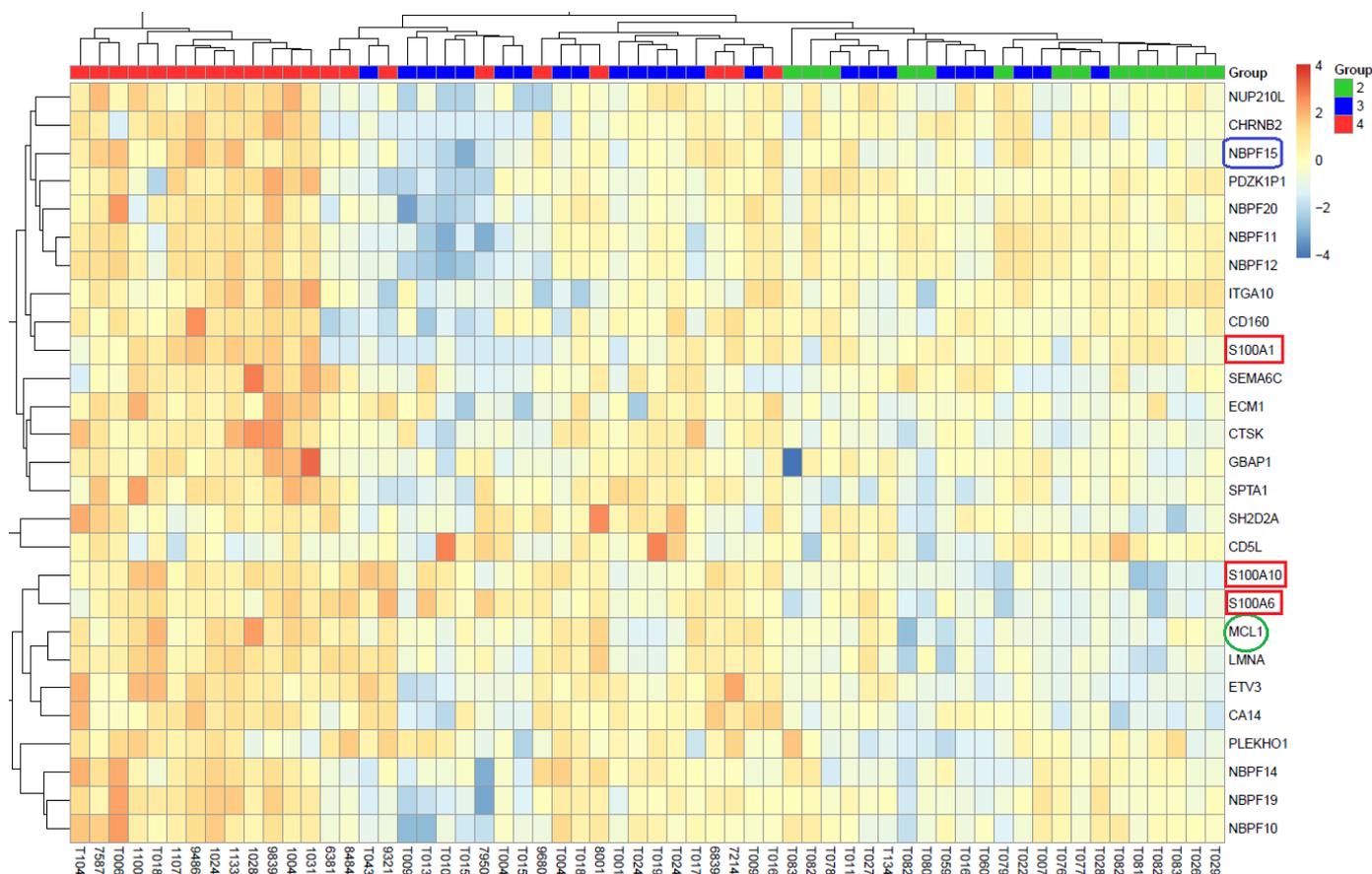


Figure 16 : Heatmap des gènes localisés sur 1q entre les groupes 4 et 3 copies.

Cette analyse met en évidence les différences d'expression génique entre les groupes 4 et 3 copies, centrée sur les gènes du 1q. Hormis les gènes impliqués dans la formation des neuroblastomes (*NBPF* – Neuroblastoma Breakpoint Family – encadré bleu) les gènes les plus exprimés par le groupe des 4 copies sont liés au transport cellulaire de calcium (encadré rouge). A noter la présence de *MCL1* (entouré en vert), appartenant à la famille des protéines anti-apoptotiques, surexprimé par le groupe des 4 copies.

c) Les voies cellulaires entre 4 et 3copies

L'analyse des voies cellulaires rend compte d'une sur-expression par le groupe des 4 copies par rapport aux 3 copies des voies de survie cellulaire en conditions de stress : conditions d'hypoxie, des voies de prolifération cellulaire. Les voies de signalisation de l'inflammation sont également surexprimées.

Discussion :

Notre étude associant une partie clinique observationnelle et une partie biologique expérimentale, nous permet sur une large cohorte française d'ajouter des informations au débat sur le pronostic du 1q. Les données observationnelles ne nous permettent pas de conclure à une différence significative tant sur la survie globale : 48,5% et 33,4 % à 60 mois entre les groupes 3 copies et 4 copies (HR = 1,49 [0,99 ; 2,23]) (p=0,051), que sur la survie sans progression : SSP à 24 mois de 30,7% et 45,8% (HR = 1,39 [0,97 ; 1,99]) pour les groupes 4 et 3 copies respectivement. Ceci dégage cependant une tendance pronostique péjorative à l'amplification 1q, d'autant que l'analyse multivariée confère à la del17p, la del1p32, la trisomie 21 et à l'amplification 1q une valeur pronostique péjorative en survie globale. Les données expérimentales nous ont permis d'apprécier les différences d'expression génique entre les différentes cohortes de patients. On remarque une surexpression significative de *CKS1b* dans le groupe 3 copies par rapport au groupe standard, cependant celui-ci ne fait pas partie des 10 gènes les plus surexprimés. L'expression génique entre les cohortes amplification 1q et gain 1q montrent une surexpression significative de plusieurs gènes de la famille S100, impliqués dans le transport calcique.

De manière générale, les différentes études rétrospectives attribuent au gain 1q, un pronostic défavorable sur la survie globale (42–47). L'impact significatif sur la survie sans progression reste débattu (48). Des affinités d'association entre différentes anomalies cytogénétiques existent, ainsi le gain 1q est très fréquemment retrouvé associé à la délétion 1p, à la délétion 13q et à la translocation (4;14) (48–50), d'où la remise en cause par certaines équipes de son impact pronostique indépendant, plutôt lié à celui de ses associations (51,52). Les techniques de biologie moléculaire telles que l'hybridation sur puce (CGH-array), puis le NGS, ont permis d'étoffer les connaissances sur la physiopathologie du gain 1q. Shaughnessy et son équipe (22) réalisèrent en 2007, un premier profil d'expression génique (GEP) chez 532 patients nouvellement diagnostiqués d'un myélome multiple, traités par un traitement d'induction + double autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Ils en tirèrent une liste de 70 gènes associés à un pronostic défavorable (SSP et survie globale raccourcies), 30% de ces gènes étaient localisés sur le chromosome 1, avec plus particulièrement des gènes surexprimés sur le bras long, et des gènes sous-exprimés sur le bras court. Le gène codant pour la protéine *CKS1B* ressortait de manière significative parmi les gènes du bras long, impliqué dans la stadification de haut risque. Chang et al en 2006, dépeint parmi une cohorte de 123 patients, le gène *CKS1B* comme marqueur de sévérité et de prolifération en corrélant un taux croissant d'expression

entre un myélome au diagnostic / à la rechute / une leucémie à plasmocytes. Il ne retrouva pas la sur-expression du gène parmi la population de MGUS (23 patients) (53). Dans le même sens, Stella et al et Bolli et al, associèrent *CKS1B* avec un taux plus élevé de β 2microglobuline et Ki67, marqueurs biologiques de la prolifération cellulaire et de la masse tumorale (23,54). Fonseca en 2006 sur une cohorte rétrospective de 159 patients et Bock en 2016 sur une cohorte de 475 patients imputaient à *CKS1B* un rôle pronostique dans la survie globale de patients atteints de myélome et autogreffés (9,55).

Le gain 1q peut compter 3 copies du bras long du chromosome, ou 4 copies (amplification 1q), jusqu'à 8 copies au maximum. L'analyse quantitative de *CKS1B* et de sa protéine par Western Blot (16,23) conclut à une augmentation de l'expression génique avec le nombre de copies. Gang et al en 2014 et Shah et al dans une méta-analyse de 2017 ne trouvaient pas de différence significative pronostique entre le gain 1q et l'amplification 1q (277 patients porteurs de 3 copies et 80 porteurs de 4 copies). A l'inverse, Walker et al en 2015, dans une étude multicentrique utilisant le whole exome sequencing sur 463 patients, décrivait un impact pronostique de l'amplification 1q sur la PFS et l'OS en comparaison au gain 1q (dont le pronostic était semblable aux patients sans gain 1q) (52). En 2019, dans le cadre du Myeloma Genome Project, Walker et al associait la délétion 17p (ou mutation biallélique de TP53) avec l'amplification de *CKS1B* chez les patients ISS3 comme sous-groupe de haut risque pronostique appelés les « double hit » (56).

Par ailleurs, parmi les gènes les plus surexprimés par la cohorte gain 1q, se trouvent : *NTRK1* et *TAGLN2*, localisés sur 1q23.1 et 1q23.2 respectivement. *NTRK1*, récepteur membranaire, se lie à la neurotrophine pour activer la voie MAP kinase par des processus de phosphorylation. Ce gène joue donc un rôle dans la prolifération cellulaire, qui peut être dévié pour servir l'oncogenèse par des variants ou des transcrits de fusion impliquant *NTRK1*. Il est l'objet de recherches et d'application clinique par thérapie ciblée, notamment pour le transcrit *ETV6-NTRK1* dans la leucémie aigüe myéloïde (38). Le gène de la Transgeline 2, codant pour une protéine de la famille des 'Actin Binding Protein', joue un rôle dans la liaison protéique avec l'actine dans les fibres musculaires. Un potentiel oncogénique a été décrit dans plusieurs néoplasies différentes notamment dans le glioblastome ou dans le cancer de vessie (41,57) où la protéine apparaît surexprimée est quantifiable dans le liquide céphalo-rachidien ou dans les urines, technique applicable en pratique clinique et extrapolable au myélome multiple. En 2017, l'équipe de Han observait un taux d'expression de la protéine croissant selon le grade de sévérité de la tumeur gliale et associait à la Transgeline un impact pronostique (41). Des études supplémentaires sur plasma médullaire nous permettraient de rechercher si *TAGLN2* constitue

un bio-marqueur fiable dans le myélome. Zhao et al (57) ont ciblé la Transgéline dans le cancer de vessie via mir133b (micro-ARN). *TAGLN2* est surexprimé dans le cancer de vessie et relié au stade avancé selon la classification TNM. Ils ont identifié que la surexpression de mir-133b inhibe l'invasion tissulaire, l'angiogenèse et augmente la chimio-sensibilité des cellules cancéreuses à la gemcitabine (anti-métabolite). Ceci peut constituer une piste de recherche intéressante dans le MM.

Les protéines S100, retrouvées dans notre étude comme surexprimées par les patients porteurs d'une amplification 1q, sont également modulées par les processus oncogéniques. Les études ont démontré que les néoplasies affichaient un profil S100 distinct en fonction du sous-type de cancer et de son stade. Les protéines S100 sont principalement surexprimées et suractivées dans la plupart des cancers comme dans le lymphome où S100A9 activée pourvoie à la lymphomagenèse (32). Elles sont décrites comme impliquées dans la croissance cellulaire, dans l'angiogenèse et dans l'échappement tumoral au système immunitaire. Elles peuvent avoir des effets contradictoires en fonction de leur conformation allostérique et de leurs cibles. Par exemple : S100A7 est décrit comme suppresseur de tumeur dans le cancer du sein ERa+, mais promeut la croissance tumorale si ER- (58). S100A4 (aussi appelée *metastatin*) est sécrétée par les TAM et les fibroblastes dans le cancer du poumon. S100A12 favoriserait l'expression de molécules d'adhésion telles que ICAM et VCAM, impliquées dans la migration cellulaire et le phénomène de métastases (33). Quant à S100A9, elle a été décrite dans la régulation de CD28/B7, molécule de co-stimulation des lymphocytes T, pouvant moduler alors la réponse immunitaire acquise et anti-tumorale (59).

De plus, plusieurs études incriminent les protéines S100 dans la résistance tumorale à la chimiothérapie, comme S100A13 associé à une résistance à la dacarbazine dans le mélanome (33), tout comme le transporteur TPR5, associé à une sur-expression de MDR1 (*Multidrug resistance 1*) codant pour la Glycoprotein-p, responsable d'un efflux cellulaire de drogues (dauxorubicine par exemple) (60). D'autres études démontrent une dérégulation de la protéine TP53, suppresseur de tumeurs, par les protéines régulatrices du calcium, notamment par S100A4 ((33)). L'altération de TP53 peut être responsable d'une moindre efficacité de la chimiothérapie et d'un pronostic défavorable. L'étude de Zhang et al publiée en 2019, a retrouvé une sous-expression du gène *CACNA1C* codant pour Cav1 (sous type de VGCC) parmi des patients atteints de lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) réfractaires au traitement standard par R-CHOP, en immunohistochimie sur des fragments tissulaires tumoraux ou par méthode de RT-PCR. Ils associèrent *CACNA1C* à une résistance à la chimiothérapie en mesurant une moindre apoptose cellulaire chez des lignées cellulaires de

DLBCL transfectées par un gène CACNA1C éteint. De même *in vivo*, chez des souris malades, où l'extinction du gène abolit le bénéfice du traitement par Rituximab. Le traitement par un agoniste calcique rétablissait l'efficacité du Rituximab sur la tumeur avec un effet synergique (61). Meister et al démontraient déjà en 2010, une synergie entre le Bortezomib (inhibiteur du protéasome - Btz), et le Verapamil (V- inhibiteur calcique ciblant les VGCC utilisé dans l'hypertension artérielle) dans le myélome multiple. En effet, sur des lignées cellulaires myélomateuses, ils décrivaient une augmentation de la mort cellulaire à l'association Btz-V. Par des techniques de Western-blot, ils associaient la perte de viabilité cellulaire à une inhibition de NFkB et à une activation de caspases. De plus, on observait en microscopie électronique une induction de mécanismes d'autophagie, reliés à une augmentation du stress endoplasmique par Btz-V (62). Dix ans plus tard, Beider et al démontraient une surexpression de TRPV1 (groupe des TRP) parmi les cellules myélomateuses issues de patients ou de lignées cellulaires. L'association de Btz à un antagoniste de TRPV1 conduisait à la mort cellulaire via l'accumulation de ROS induisant un stress mitochondrial, de manière temps-dépendante et dose-dépendante. Parallèlement on remarquait une baisse d'expression de CXCR4, chimiokine impliquée dans la migration cellulaire, et des protéines anti-apoptotiques BCL2 et MCL1, décrites dans le myélome multiple (63). Plus récemment encore, Samart et al, décrivaient une diminution de la mobilité cellulaire dans des lignées de myélome après traitement par inhibiteur calcique. Par la technique de Crispr/Cas9, ils reliaient ces résultats à l'extinction de STIM1, ORAI1 et TRPM7. En effet, ces transporteurs sont impliqués dans la régulation de l'O-GlcNAcylation. Son activation entraîne une diminution de la mobilité des cellules du myélome en agissant notamment sur des intégrines. L'hypothèse fut vérifiée sur un modèle murin avec une réduction de la masse tumorale à l'interruption du dialogue entre l'O-GlcNAcylation et le calcium (64).

Un autre abord serait d'utiliser les protéines S100 dérégulées comme biomarqueurs tumoraux. A l'heure où de nouvelles techniques de dépistage précoce et moins invasives se développent (ADN circulant tumoral notamment), le dépistage de protéines S100, ubiquitaires (intra-tumorales, cellules métastatiques, liquide céphalo-rachidien, urines, salives...) serait un outil intéressant. Cela a déjà été testé notamment dans le glioblastome et dans le cancer du sein avec la mesure de S100A4 (33). Cela pourrait être une piste intéressante de recherche dans le myélome multiple où les techniques d'ADN circulant tumoral pour le moment ne s'avèrent pas probantes (65). Cependant, les protéines S100 étant des protéines de stress, également sécrétées dans les maladies neurodégénératives ou dans les maladies inflammatoires et dysimmunitaires, un manque de spécificité serait à prendre en considération.

Enfin, on remarque une surexpression des voies de survie cellulaire en conditions de stress et des voies de l'inflammation dans le groupe 4 copies versus 3 copies. Il a été décrit une interaction entre le métabolisme calcique et les voies de stress, notamment dans le microenvironnement tumoral, favorisant par exemple la croissance cellulaire en conditions d'hypoxie (66).

L'avantage de notre analyse est une vue d'ensemble du transcriptome chez une population homogène, traitée avec les standards de traitements actuels, en comparaison avec les précédentes études utilisant le GEP. Le RNA-sequencing représente une technique de pointe et à la sensibilité supérieure aux techniques de CGH-array. La cohorte reste de faible effectif mais cependant avec une proportion de 4 copies représentative. Les résultats rencontrés semblent cohérents et en accord avec des précédentes recherches dans le domaine de la cancérologie. Des pistes sont ouvertes quant à l'implication du métabolisme calcique dans la tendance défavorable de l'amplification 1q, agissant sur des multiples de voies de régulation cellulaire détournées dans la myélomagenèse.

Conclusion :

Le gain 1q est une des anomalies cytogénétiques les plus fréquentes parmi la population de patients atteints de myélome multiple. Les mécanismes physiopathologiques de son pronostic défavorable demeurent encore peu expliqués. *CKS1B*, gène codant pour une protéine intervenant sur le cycle cellulaire est imputé depuis une quinzaine d'années sans démonstration formelle et sans aboutir à des fins thérapeutiques. L'analyse transcriptomique nous a permis de mettre en évidence une surexpression de gènes d'intérêt comme les protéines S100. Cibler le transport calcique semble une piste intéressante et peu étudiée pour le moment dans le myélome multiple. L'analyse observationnelle de notre cohorte de patients a montré une survie sans progression et une survie globale diminuées parmi les patients porteurs de 4 copies par rapport à 3 copies, de manière non significative. L'amplification 1q semble induire une sur-expression des voies de survie cellulaire, particulièrement en conditions de stress, pouvant poser la question d'une résistance aux thérapeutiques utilisées dans le myélome multiple. De nouvelles pistes de recherche semblent s'ouvrir à la vue de ces résultats, quant à la compréhension physiopathologique du gain 1q et de son impact pronostique. L'analyse de la maladie résiduelle apporterait aussi des réponses quant au pronostic de ces patients, à l'échelle moléculaire.

Bibliographie :

1. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol.* déc 2016;43(6):676-81.
2. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, Mateos MV, Zamagni E, Avet-Loiseau H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* 1 juill 2017;28(suppl_4):iv52-61.
3. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer J.* sept 2020;10(9):94.
4. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2 mai 2019;380(18):1726-37.
5. Chim CS, Kumar SK, Orlowski RZ, Cook G, Richardson PG, Gertz MA, et al. Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond. *Leukemia.* 2018;32(2):252-62.
6. Greipp PR, Miguel JS, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International Staging System for Multiple Myeloma. *J Clin Oncol.* 20 mai 2005;23(15):3412-20.
7. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol.* 10 sept 2015;33(26):2863-9.
8. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular Pathogenesis and a Consequent Classification of Multiple Myeloma. *J Clin Oncol.* 10 sept 2005;23(26):6333-8.
9. Fonseca R, Van Wier SA, Chng WJ, Ketterling R, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia.* nov 2006;20(11):2034-40.
10. Perrot A, Lauwers-Cances V, Tournay E, Hulin C, Chretien M-L, Royer B, et al. Development and Validation of a Cytogenetic Prognostic Index Predicting Survival in Multiple Myeloma. *J Clin Oncol.* 15 mai 2019;JCO.18.00776.
11. Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, Kaul R, Swarbreck D, Dunham A, et al. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature.* mai 2006;441(7091):315-21.
12. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood.* 14 oct 2010;116(15):e56-65.
13. Siu KT, Huang C, Panaroni C, Mukaihara K, Fulzele K, Soucy R, et al. BCL2 blockade overcomes MCL1 resistance in multiple myeloma. *Leukemia* [Internet]. 28 févr 2019 [cité 8 juin 2019]; Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41375-019-0421-0>
14. Gupta VA, Matulis SM, Conage-Pough JE, Nooka AK, Kaufman JL, Lonial S, et al. Bone marrow microenvironment-derived signals induce Mcl-1 dependence in multiple myeloma. *Blood.* 6 avr 2017;129(14):1969-79.

15. Mani M, Carrasco DE, Zhang Y, Takada K, Gatt ME, Dutta-Simmons J, et al. BCL9 Promotes Tumor Progression by Conferring Enhanced Proliferative, Metastatic, and Angiogenic Properties to Cancer Cells. *Cancer Res.* 1 oct 2009;69(19):7577-86.
16. Shaughnessy J. Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma. *Hematol Amst Neth.* 2005;10 Suppl 1:117-26.
17. Akyurek N, Drakos E, Giaslakitotis K, Knoblock RJ, Abruzzo LV, Ning Y, et al. Differential expression of CKS-1B in typical and blastoid variants of mantle cell lymphoma. *Hum Pathol.* oct 2010;41(10):1448-55.
18. Salgado R, Toll A, Alameda F, Baró T, Martín-Ezquerria G, Sanmartín O, et al. CKS1B amplification is a frequent event in cutaneous squamous cell carcinoma with aggressive clinical behaviour. *Genes Chromosomes Cancer.* nov 2010;49(11):1054-61.
19. Lee S-W, Lin C-Y, Tian Y-F, Sun D-P, Lin L-C, Chen L-T, et al. Overexpression of CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B confers an independent prognostic factor in nasopharyngeal carcinoma. *APMIS.* mars 2014;122(3):206-14.
20. Liu Y, Wang W, Li Y, Sun F, Lin J, Li L. CKS1BP7, a Pseudogene of CKS1B, is Co-Amplified with IGF1R in Breast Cancers. *Pathol Oncol Res.* avr 2018;24(2):223-9.
21. Gratijs EJ, Dome JS, Jennings LJ, Chi Y-Y, Tian J, Anderson J, et al. Association of Chromosome 1q Gain With Inferior Survival in Favorable-Histology Wilms Tumor: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 10 sept 2016;34(26):3189-94.
22. Shaughnessy JD, Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood.* 15 mars 2007;109(6):2276-84.
23. Stella F, Pedrazzini E, Baialardo E, Fantl DB, Schutz N, Slavutsky I. Quantitative analysis of CKS1B mRNA expression and copy number gain in patients with plasma cell disorders. *Blood Cells Mol Dis.* sept 2014;53(3):110-7.
24. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* mars 2011;144(5):646-74.
25. Monteith GR, Prevarskaya N, Roberts-Thomson SJ. The calcium–cancer signalling nexus. *Nat Rev Cancer.* juin 2017;17(6):373-80.
26. Cantonero C, Sanchez-Collado J, Gonzalez-Nuñez MA, Salido GM, Lopez JJ, Jardin I, et al. Store-independent Orai1-mediated Ca²⁺ entry and cancer. *Cell Calcium.* juin 2019;80:1-7.
27. Déliot N, Constantin B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* oct 2015;1848(10):2512-22.
28. Zhong T, Pan X, Wang J, Yang B, Ding L. The regulatory roles of calcium channels in tumors. *Biochem Pharmacol.* nov 2019;169:113603.
29. O'Reilly D, Buchanan P. Calcium channels and cancer stem cells. *Cell Calcium.* juill 2019;81:21-8.
30. Bong AHL, Monteith GR. Calcium signaling and the therapeutic targeting of cancer cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* nov 2018;1865(11):1786-94.

31. Wang W, Ren Y, Wang L, Zhao W, Dong X, Pan J, et al. Orai1 and Stim1 Mediate the Majority of Store-Operated Calcium Entry in Multiple Myeloma and Have Strong Implications for Adverse Prognosis. *Cell Physiol Biochem*. 2018;48(6):2273-85.
32. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. févr 2015;15(2):96-109.
33. Gonzalez LL, Garrie K, Turner MD. Role of S100 proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. juin 2020;1867(6):118677.
34. Brenner AK, Bruserud Ø. S100 Proteins in Acute Myeloid Leukemia. *Neoplasia*. déc 2018;20(12):1175-86.
35. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. nov 2014;15(12):e538-48.
36. Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. juin 2008;27(2):253-61.
37. Fumoto S, Hiyama K, Tanimoto K, Noguchi T, Hihara J, Hiyama E, et al. EMP3 as a tumor suppressor gene for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. févr 2009;274(1):25-32.
38. Taylor J, Pavlick D, Yoshimi A, Marcelus C, Chung SS, Hechtman JF, et al. Oncogenic TRK fusions are amenable to inhibition in hematologic malignancies. *J Clin Invest*. 31 août 2018;128(9):3819-25.
39. Lipska BS, Drożynska E, Scaruffi P, Tonini GP, Iżycka-Świeszewska E, Ziętkiewicz S, et al. c.1810C>T Polymorphism of NTRK1 Gene is associated with reduced Survival in Neuroblastoma Patients. *BMC Cancer* [Internet]. déc 2009 [cité 8 juin 2019];9(1). Disponible sur: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-9-436>
40. Meng T, Liu L, Hao R, Chen S, Dong Y. Transgelin-2: A potential oncogenic factor. *Tumor Biol*. juin 2017;39(6):101042831770265.
41. Han M-Z, Xu R, Xu Y-Y, Zhang X, Ni S-L, Huang B, et al. TAGLN2 is a candidate prognostic biomarker promoting tumorigenesis in human gliomas. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. déc 2017 [cité 8 juin 2019];36(1). Disponible sur: <http://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-017-0619-9>
42. Nemeč P, Zemanová Z, Gresliková H, Michalová K, Filková H, Tajtlová J, et al. Gain of 1q21 Is an Unfavorable Genetic Prognostic Factor for Multiple Myeloma Patients Treated with High-Dose Chemotherapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. avr 2010;16(4):548-54.
43. Avet-Loiseau H, Attal M, Campion L, Caillot D, Hulin C, Marit G, et al. Long-Term Analysis of the IFM 99 Trials for Myeloma: Cytogenetic Abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] Play a Major Role in Defining Long-Term Survival. *J Clin Oncol*. juin 2012;30(16):1949-52.
44. Varma A, Sui D, Milton DR, Tang G, Saini N, Hasan O, et al. Outcome of Multiple Myeloma with Chromosome 1q Gain and 1p Deletion after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Propensity Score Matched Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. avr 2020;26(4):665-71.

45. Locher M, Steurer M, Jukic E, Keller MA, Fresser F, Ruepp C, et al. The prognostic value of additional copies of 1q21 in multiple myeloma depends on the primary genetic event. *Am J Hematol.* déc 2020;95(12):1562-71.
46. Schmidt TM, Fonseca R, Usmani SZ. Chromosome 1q21 abnormalities in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* avr 2021;11(4):83.
47. Schmidt TM, Barwick BG, Joseph N, Heffner LT, Hofmeister CC, Bernal L, et al. Gain of Chromosome 1q is associated with early progression in multiple myeloma patients treated with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone. *Blood Cancer J.* déc 2019;9(12):94.
48. on behalf of the NCRI Haemato-oncology CSG, Shah V, Sherborne AL, Walker BA, Johnson DC, Boyle EM, et al. Prediction of outcome in newly diagnosed myeloma: a meta-analysis of the molecular profiles of 1905 trial patients. *Leukemia.* janv 2018;32(1):102-10.
49. Bergsagel PL, Chesi M. V. Molecular classification and risk stratification of myeloma: MM: molecular classification and risk stratification. *Hematol Oncol.* juin 2013;31(S1):38-41.
50. Szalat R, Avet-Loiseau H, Munshi NC. Gene Expression Profiles in Myeloma: Ready for the Real World? *Clin Cancer Res.* 15 nov 2016;22(22):5434-42.
51. Chang H, Qi X, Trieu Y, Xu W, Reader JC, Ning Y, et al. Multiple myeloma patients with CKS1B gene amplification have a shorter progression-free survival post-autologous stem cell transplantation. *Br J Haematol.* nov 2006;135(4):486-91.
52. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol.* 20 nov 2015;33(33):3911-20.
53. Chang H, Yeung J, Xu W, Ning Y, Patterson B. Significant increase of CKS1B amplification from monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma and plasma cell leukaemia as demonstrated by interphase fluorescence in situ hybridisation. *Br J Haematol.* sept 2006;134(6):613-5.
54. Bolli N, Biancon G, Moarii M, Gimondi S, Li Y, de Philippis C, et al. Analysis of the genomic landscape of multiple myeloma highlights novel prognostic markers and disease subgroups. *Leukemia.* déc 2018;32(12):2604-16.
55. Bock F, Lu G, Srour SA, Gaballa S, Lin HY, Baladandayuthapani V, et al. Outcome of Patients with Multiple Myeloma and CKS1B Gene Amplification after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* déc 2016;22(12):2159-64.
56. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, Ashby TC, Bauer M, Davies F, et al. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia.* janv 2019;33(1):159-70.
57. Zhao F, Zhou L-H, Ge Y-Z, Ping W-W, Wu X, Xu Z-L, et al. MicroRNA-133b suppresses bladder cancer malignancy by targeting TAGLN2-mediated cell cycle: ZHAO ET AL. *J Cell Physiol.* avr 2019;234(4):4910-23.
58. Yang S, Zhang JJ, Huang X-Y. Orai1 and STIM1 Are Critical for Breast Tumor Cell Migration and Metastasis. *Cancer Cell.* févr 2009;15(2):124-34.
59. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med.* janv 2013;13(1):24-57.

60. Tsubaki M, Satou T, Itoh T, Imano M, Komai M, Nishinobo M, et al. Overexpression of MDR1 and survivin, and decreased Bim expression mediate multidrug-resistance in multiple myeloma cells. *Leuk Res.* oct 2012;36(10):1315-22.
61. Zhang J-Y, Zhang P-P, Zhou W-P, Yu J-Y, Yao Z-H, Chu J-F, et al. L-Type Cav 1.2 Calcium Channel- α -1C Regulates Response to Rituximab in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 1 juill 2019;25(13):4168-78.
62. Meister S, Frey B, Lang VR, Gaipf US, Schett G, Schlötzer-Schrehardt U, et al. Calcium Channel Blocker Verapamil Enhances Reticulum Stress and Death Induced by Proteasome Inhibition in Myeloma Cells. *Neoplasia.* juill 2010;12(7):550-IN3.
63. Beider K, Rosenberg E, Dimenshtein-Voevoda V, Sirovsky Y, Vladimirovsky J, Magen H, et al. Blocking of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) promotes terminal mitophagy in multiple myeloma, disturbing calcium homeostasis and targeting ubiquitin pathway and bortezomib-induced unfolded protein response. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol.* déc 2020;13(1):158.
64. Samart P, Luanpitpong S, Rojanasakul Y, Issaragrisil S. O-GlcNAcylation homeostasis controlled by calcium influx channels regulates multiple myeloma dissemination. *J Exp Clin Cancer Res.* déc 2021;40(1):100.
65. Mazzotti C, Buisson L, Maheo S, Perrot A, Chretien M-L, Leleu X, et al. Myeloma MRD by deep sequencing from circulating tumor DNA does not correlate with results obtained in the bone marrow. *Blood Adv.* 13 nov 2018;2(21):2811-3.
66. Marchi S, Giorgi C, Galluzzi L, Pinton P. Ca²⁺ Fluxes and Cancer. *Mol Cell.* juin 2020;78(6):1055-69.

ANALYSE PRONOSTIQUE ET TRANSCRIPTOMIQUE DE PATIENTS ATTEINTS DE MYELOME MULTIPLE AVEC GAIN 1q

Introduction : Le gain 1q porte un pronostic défavorable dans le myélome multiple. L'objectif de l'étude était de comparer la survie de patients porteurs de gains 1q et d'une amplification 1q (plus de 3 copies). Nous avons réalisé une analyse transcriptomique afin d'apprécier les processus moléculaires en rapport.

Patients et Méthodes : L'analyse observationnelle retrospective portait sur 219 patients : 180 avec un gain 1q et 39 avec une amplification. Les patients avaient été traités de manière homogène : immunomodulateurs ou agents alkylants +/- inhibiteurs du protéasome + corticoïdes, avec une intensification thérapeutique et autogreffe de cellules souches. Le suivi médian était de 44 mois. L'analyse transcriptomique a porté sur 24 échantillons avec gain 1q, 22 avec amplification et 14 échantillons contrôles, sans gain 1q.

Résultats : Il n'y a pas de différence significative retrouvée sur la survie globale : 48,5% et 33,4 % à 60 mois entre les groupes 3 copies et 4 copies (HR = 1,49 [0,99 ; 2,23]) (p=0,051), ou sur la survie sans progression : PFS à 24 mois de 45,8% et 30,7% (HR = 1,39 [0,97 ; 1,99]). *CKS1B*, *TAGLN2* et *NTRK1* sont surexprimés dans la cohorte gain 1q. On retrouve une surexpression significative de plusieurs gènes de la famille S100 dans la cohorte avec amplification 1q, impliqués dans le transport calcique.

Conclusion : l'analyse observationnelle n'a pas retrouvé de différence significative mais une tendance péjorative de l'amplification 1q par rapport au gain 1q sur la survie globale. L'analyse transcriptomique retrouve l'implication du gène *CKS1B* dans la physiopathologie du gain 1q et une surexpression des protéines S100.

Mots clés : Myélome multiple – Gain 1q – *CKS1B* – transport calcique – S100

PROGNOSIS AND TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF MULTIPLE MYELOMA PATIENTS WITH GAIN 1q

Objective : gain 1q has unfavourable prognosis in multiple myeloma. The aim of this study is to compare global survival of patients with gain 1q and amplification 1q (more than 3 copies). We performed RNA-sequencing analysis to appreciate molecular pathway indeed.

Patients and Methods : We performed a retrospective statistical analysis of 219 patients cohort composed by 180 gain 1q and 39 amplification. Patients were homogeneously treated : immunomodulators or alkylating agent +/- proteasome inhibitor and steroids, with intensification and stem cell transplantation. Median follow up was 44 months. RNA-sequencing was performed on 24 gain 1q samples, 22 amplification 1q samples and 14 with no gain.

Results : Progression free survival showed no significant difference between gain 1q and amplification. Amplification 1q showed worst overall survival : 33,4 % versus 48,5% at 60 months, p= 0,051 (HR = 1,49 [0,99 ; 2,23]). RNA-sequencing showed upregulation of *CKS1B*, *TAGLN2* and *NTRK1* in gain 1q. Genes coding for calcium binding protein and transport like S100 family proteins seems involved in pathological amplification 1q.

Conclusion : Amplification 1q seems to have worst prognosis on overall survival than gain 1q. Cellular cycle genes may be involved, as calcium transport genes.

Key Words : Multiple myeloma – gain 1q – *CKS1B* – calcium binding – S100