

TABLE DES MATIÈRES :

I PARTIE THÉORIQUE

1. INTRODUCTION	1
2. PHYSIOLOGIE	2
2.1 La lignée plasmocytaire.....	2
2.2 L'immunophénotypage plasmocytaire.	3
2.2.1 Marqueurs B.....	4
2.2.2 Marqueurs de la lignée plasmocytaire.....	4
2.2.3 Autres marqueurs phénotypiques.	5
3. PHYSIOPATHOLOGIE	5
3.3 Les molécules d'adhésion	6
3.4 Cytokines et chemokines.....	6
3.5 Angiogenèse	7
3.6 Mécanismes de l'ostéopathie associée au myélome.....	7
3.6.1 Augmentation de la résorption osseuse	8
3.6.2 Diminution de l'activité ostéoblastique.....	8
3.7 Oncogenèse	8
4. ÉPIDÉMIOLOGIE	11
5. CLINIQUE	11
5.1 Douleurs osseuses.....	11
5.2 Atteinte rénale	11
5.3 Manifestations neurologiques.....	12
5.4 Amylose AL	12
5.5 Complications infectieuses.....	12
5.6 Syndrome d'hyperviscosité	13
5.7 Autres manifestations.....	13
6. RADIOLOGIE	13
6.1 Radiologie conventionnelle	13
6.2 Scintigraphie osseuse	13

6.3 La tomodensitométrie.....	13
6.4 Imagerie par résonance magnétique	14
6.5 Tomodensitométrie par émission de positrons (TEP Scanner)	14
7. BIOLOGIE	14
7.1 Détection et quantification de l'Ig monoclonale	14
7.1.1 Analyse du sérum	14
7.1.1.1 Dosage des protéines sériques totales.....	14
7.1.1.2 Electrophorèse des protéines	15
7.1.1.3 Immunofixation ou immunoélectrophorèse des protéines sériques.....	15
7.1.1.4 Dosage pondéral des Ig dans le sérum	15
7.1.2 Analyse des urines.....	15
7.1.3 Intérêt du dosage des chaînes légères libres sériques	16
7.2 Autres paramètres biochimiques	16
7.2.1 Créatininémie	16
7.2.2 Paramètres métaboliques.....	16
7.2.3 Vitesse de sédimentation globulaire.....	16
7.2.4 Protéine C réactive	17
7.2.5 β 2-microglobuline sérique et lactate déshydrogénases	17
7.3 Hémogramme	17
7.4 Myélogramme	18
7.4.1 Plasmocytose médullaire.....	18
7.4.2 Morphologie plasmocytaire.....	18
7.4.3 Autres lignées cellulaires.....	19
7.5 Cytogénétique.....	19
7.6 Cytométrie en flux.....	20
7.6.1 Caractéristiques phénotypiques du plasmocyte malin.....	20
7.6.2 Marqueurs de repérage	22
8. DIAGNOSTIC	22
9. CLASSIFICATIONS ET FACTEURS PRONOSTICS.....	23

9.1 La classification de Durie-Salmon (DS).....	23
9.2 L'ISS: International Staging System (ISS).....	24
9.3 ISS-Révisé.....	25
10. FORMES CLINIQUES	26
11.1 Le MM asymptomatique dit indolent (SMM, smoldering myeloma)	26
11.2 Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS)	26
11.3 Le MM non excréteur ou non sécrétant.....	26
11.4 Le plasmocytome	26
11. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL	26
12. TRAITEMENT.....	27
12.1 Traitement anti tumoral	27
12.1.1 Les moyens thérapeutiques utilisés	27
12.1.1.1 Les molécules de chimiothérapie	27
12.1.1.2 Nouvelles molécules.....	28
12.1.1.3 Intensification et autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	31
12.1.1.4 L'allogreffe de CSH	31
12.1.2 Stratégies thérapeutiques.....	31
12.1.2.1 Patient éligible à une intensification suivie d'une autogreffe de CSH	31
12.1.2.2 Patients non éligibles à l'intensification.....	32
12.2 Traitement de support.....	32
12.2.1 Les antalgiques	32
12.2.2 Les biphosphonates	32
12.2.3 Les antibiotiques.....	33
12.2.4 Les antiviraux	33
12.2.5 Les agents stimulants l'érythropoïèse	33
12.2.6 Les transfusions sanguines	34
12.2.7 La radiothérapie à visé antalgique.....	34
12.3 Traitement du myélome en rechute	34
13. CRITÈRES DE RÉPONSE.....	34

13.1 Méthodes d'évaluation de la réponse	34
13.1.1 Le médullogramme :.....	34
13.1.2 L'évaluation du composant monoclonal sérique ou urinaire.....	34
13.1.3 Ratio FLC.....	35
13.1.4 Evaluation de la réponse par biologie moléculaire.....	35
13.1.5 Cytométrie en flux.....	35
13.2 Problèmes liés à la surveillance de la maladie	35
13.3 Concept de la maladie résiduelle	37
13.3.1 Critères d'évaluation de la maladie résiduelle.....	37
13.3.2 Choix du marqueur et de la technique	37
14. LA CYTOMÉTRIE EN FLUX	39
14.1 Définition.....	39
14.2 Principes	39
14.2.1 Composition d'un cytomètre	39
14.2.2 Collecte des signaux optiques cellulaires	41
14.2.2.1 Le système optique	41
14.2.2.2 Les miroirs dichroïques et les filtres	43
14.2.3 La fluorescence :	45
14.2.3.1 Le fluorochrome	45
14.2.3.2 Caractéristiques spectrales.....	45
14.2.3.3 Le marquage avec les anticorps fluorescents	46
14.2.4 Technique d'analyse :	46
14.2.5 Le réglage du cytomètre	46
15. APPLICATION DE LA CMF DANS LA MRD.....	47
1.PROBLEMATIQUE.....	49
2. OBJECTIFS.....	50
2.1 Objectif primaire	50
2.2 Objectif secondaire.....	50
3. PATIENTS ET METHODES.....	50

3.1 Type de l'étude.....	50
3.2 Patients	50
3.2.1 Critères d'inclusion	50
3.2.2 Critères d'exclusion.....	50
3.2.3 Données cliniques et biologiques analysées.....	50
3.3. Méthodologie.....	51
3.3.1 Diagnostic du MM.....	51
3.3.2 Classifications adoptées.....	52
3.3.3 Bilan des complications.....	52
3.3.4 Indications thérapeutiques.....	52
3.3.5 Bilan préthérapeutique	52
3.3.6 Le traitement.....	53
3.3.6.1 Traitement symptomatique.....	53
3.3.6.1.1 Traitement de l'anémie.....	53
3.3.6.1.2 Traitement de la douleur.....	53
3.3.6.1.3 Traitement orthopédique	53
3.3.6.1.4 Traitement des infections	53
3.3.6.1.5 Traitement de l'hypercalcémie	53
3.3.6.1.6 Traitement de l'insuffisance rénale	53
3.3.6.1.7 Prophylaxie et traitement des thromboses.....	54
3.3.6.2 Traitement spécifique	54
3.3.6.2.1 Chimiothérapie d'induction.....	54
3.3.6.2.2 Intensification et autogreffe de CSH	55
3.3.6.2.2.1 La phase de mobilisation.....	55
3.3.6.2.2.2 Cytaphérèse des CSH	55
3.3.6.2.2.3 La quantification et conservation des CSH (CD34 ⁺).....	55
3.3.6.2.2.4 Le conditionnement ou intensification	55
3.3.6.2.2.5 Perfusion des CD34 ⁺	55
3.3.7 Gestion de la phase d'aplasie	55

3.3.8 Evaluation de la réponse post autogreffe à J100	56
3.3.8.1 Les moyens conventionnels d'évaluation de la réponse.....	56
3.3.8.2 La quantification de la MRD par CMF	56
3.3.8.2.1 La phase de prélèvement	56
3.3.8.2.2 La phase d'analyse par la cytométrie en flux	57
3.3.8.2.2.1 Le cytomètre utilisé BD FACS CantoII	57
3.3.8.2.2.2 Réglage de l'appareil.....	57
3.3.8.2.3 Validation de la technique	57
3.3.8.2.3.1 Les témoins.....	57
3.3.8.2.3.1.1 Le témoin négatif.....	58
3.3.8.2.3.1.2 Le témoin positif :	59
3.3.8.3.2 Le SPIKE.....	62
3.3.8.3.2.1 Les protocoles étudiés	62
3.3.9 Méthodes d'évaluation de la MRD.....	65
3.3.9.1 Première méthode d'analyse (1 ^{er} protocole).....	66
3.3.9.2 Deuxième méthode d'analyse (2 ^{ème} protocole).....	66
3.3.9.3 Troisième méthode d'analyse (3 ^{ème} protocole).....	67
3.3.9.3.1 Procédure d'immunomarquage de la troisième méthode	67
3.3.9.3.2 L'évaluation de la MRD.....	68
3.3.9.3.2.1 Etape de backbone :.....	68
3.3.9.3.2.2 Les témoins internes	69
3.3.9.3.2.3 Interprétation	71
3.3.9.3.3 L'évaluation des résultats	71
4 RESULTATS.....	71
4.1 Etude descriptive des patients	71
4.1.1. Données anthropologiques	71
4.1.2 Etude clinique.....	72
4.1.3 Etude biologique.....	72
4.1.3.1 Hémogramme	72

4.1.3.2 Protidogramme	72
4.1.3.3 Etude cytologique.....	73
4.1.3.4 Bilan radiologique	73
4.1.3.5 Autres paramètres biologiques	73
4.1.4 Classifications	74
4.1.5 Protocoles de chimiothérapie d'induction	74
4.1.6 Résultats thérapeutiques après chimiothérapie d'induction	74
4.1.7 Résultats de l'intensification	75
4.1.8 Résultats thérapeutiques après intensification et autogreffe.....	75
4.1.8.1 Evaluation de la réponse avec les moyens conventionnels à J100	75
4.1.8.2 Résultats de l'évaluation de la réponse post-autogreffe par MRD (CMF).....	76
4.1.8.2.1 Validation de la technique d'évaluation de la MRD par la CMF	76
4.1.8.2.2 Résultats de l'évaluation de la MRD par la CMF	77
4.1.9 Evaluation de la survie des patients.....	78
4.1.10 Evaluation de la survie selon les résultats de la MRD	80
6. DISCUSSION	84

PERSPECTIVES

CONCLUSION

LISTE DES ABREVIATIONS

FIGURES

TABLEAUX

BIBLIOGRAPHIE

PARTIE THEORIQUE

1. INTRODUCTION

Le myélome multiple (MM) est la troisième hémopathie maligne par ordre de fréquence, après les lymphomes non hodgkiniens et les leucémies aiguës. Si cette pathologie est plutôt décrite chez le sujet âgé, en Algérie environ la moitié des patients a moins de 65 ans au moment du diagnostic. Ce facteur âge n'est pas à négliger, car la stratégie thérapeutique en dépend [1].

Au cours des deux dernières décennies, la survie des patients atteints de MM s'est significativement améliorée. A partir des années 90, ce sont tout d'abord les sujets jeunes (moins de 60 ans) qui ont bénéficié d'un gain de survie avec la mise en place de traitements intensifs suivis d'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) [2]. Quelques années plus tard, entre la fin des années 90 et le début des années 2000, l'arrivée de nouvelles molécules telles que les immunomodulateurs (thalidomide et lénalidomide) ainsi que les inhibiteurs du protéasome (représentés par le bortézomib), a constitué une avancée thérapeutique pour l'ensemble des patients, y compris pour les patients les plus âgés, non éligibles à la greffe en raison de leur âge ou de leurs comorbidités [3].

Malgré ces avancées spectaculaires sur le plan thérapeutique, le MM demeure une maladie incurable et les rechutes sont inévitables. En première ligne, l'intensification thérapeutique suivie d'une autogreffe est le traitement de référence chez le sujet jeune de moins de 65 ans. En situation de rechute, il n'existe pas de gold standard et les options thérapeutiques sont multiples.

La valeur pronostique positive de l'obtention d'une réponse complète (RC) après traitement intensif est maintenant bien démontrée [4]. Les efforts sont aujourd'hui concentrés sur l'évaluation précise de cette réponse avec l'apparition de nouvelles catégories de réponse complète, telles la réponse stringente, la réponse immunophénotypique ou la réponse moléculaire. La RC stringente, basée sur la normalisation du ratio des chaînes légères libres sériques, ne semble pas assez sensible pour intégrer les techniques d'évaluation de la maladie résiduelle (MRD) dans le myélome multiple. La MRD peut donc être évaluée par cytométrie en flux multiparamétrique ou par biologie moléculaire utilisant une PCR allele-spécifique. La cytométrie en flux bien que moins sensible, semble applicable à une plus grande proportion de patients et est plus adaptée à une utilisation de routine.

L'étude immunophénotypique des cellules de la lignée plasmocytaire est réalisée depuis plus de 15 ans [5]. Bien que largement utilisé et recommandé selon des référentiels bien établis pour le diagnostic et la prise en charge des hémopathies aiguës et des syndromes lymphoprolifératifs,

l'immunophénotypage des cellules malignes ne fait pas encore partie à ce jour des analyses biologiques de pratique courante dans le MM.

Néanmoins, les données publiées ces dernières années dans la littérature montrent que le phénotype plasmocytaire est aujourd'hui bien établi et permet de différencier les cellules malignes des cellules normales. Elles témoignent de l'intérêt croissant pour l'immunophénotypage plasmocytaire par cytométrie en flux (CMF), avec un bénéfice clinique potentiel pour les patients chez qui le diagnostic de MM (ou autre pathologie plasmocytaire) est suspecté ou établi.

La place de cette analyse phénotypique se définit selon trois axes principaux ; au diagnostic (diagnostic différentiel, absence de critère(s) de diagnostic usuel(s)), pour le pronostic (valeur pronostique de certains marqueurs phénotypiques) et sur le plan thérapeutique (évaluation de la maladie résiduelle (MRD)).

Ce travail a pour but d'évaluer par cytométrie en flux (immunophénotypage plasmocytaire), la maladie résiduelle du MM dans l'ouest Algérien.

Il se compose d'une première partie où les patients ont été recrutés selon les recommandations de l'IMWG. Le traitement a comporté une chimiothérapie d'induction suivie d'une intensification et autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. L'évaluation de la réponse a été réalisée à J100 post-autogreffe à l'aide des examens conventionnels. La seconde partie du travail a consisté à évaluer la MRD par la CMF.

2. PHYSIOLOGIE

2.1 La lignée plasmocytaire.

Le plasmocyte est la cellule terminale de la différenciation lymphocytaire B. Il est avec les lymphocytes B mémoires, l'aboutissement du processus de sélection et de maturation des cellules B spécifiques d'un antigène. Les lymphocytes B naïfs sont produits dans la moelle osseuse, transitent par le sang périphérique et vont se différencier au contact de l'antigène en lymphocyte B mémoire ou en plasmocyte dans les organes lymphoïdes secondaires. Le plasmocyte migre ensuite vers la moelle osseuse pour se différencier en plasmocyte mature, synthétisant en grande quantité une protéine spécifique, l'immunoglobuline (Ig), effecteur de la réponse immunitaire de type humorale.

L'évolution du phénotype B au cours de la lymphopoïèse [6] est marquée par, outre le BCR, l'apparition de plusieurs molécules caractéristiques de la lignée lymphocytaire B à la surface des cellules B au fur et à mesure de leur différenciation.

L'antigène CD19 est le premier marqueur B détectable (stade pro-B). Son expression persiste tout au long de la différenciation et de la maturation des cellules B. Au cours de la lymphopoïèse, il joue un rôle important dans la différenciation des cellules B. Au cours de l'immunopoïèse, il régule la transduction intracellulaire du signal du BCR [6].

L'antigène CD20 est exprimé sur toutes les cellules B, excepté les lymphocytes pro-B.

L'antigène CD21 apparaît au stade des cellules B matures. C'est un récepteur du fragment du complément C3d et du virus d'Epstein-Barr. Il interagit avec le CD19 pour générer et moduler les signaux transmembranaires au cours de l'immunopoïèse [6].

L'antigène CD22 est exprimé dans le cytoplasme des cellules B dès les stades les plus précoces de différenciation (pro-B). Il apparaît à la surface cellulaire à la fin de la lymphopoïèse. Il intervient au cours de l'immunopoïèse dans la survie des cellules B et régule négativement le signal du BCR [6].

L'antigène CD23 apparaît comme le CD21, au stade de cellule B mûre. Il s'agit d'un récepteur de faible affinité pour les IgE.

L'antigène CD27 a une expression restreinte aux cellules centrogerminatives, les cellules mémoires et les plasmocytes. Son ligand CD70 est exprimé par les cellules B et T activées.

L'antigène CD40 est exprimé à la surface des cellules B dès le stade pré-B. Son ligand CD40L (CD154) est exprimé par les cellules T.

L'antigène CD72 est un marqueur pan-B (exprimé sur toutes les cellules B). Il intervient comme régulateur négatif de la transduction du signal du BCR lors de l'immunopoïèse.

L'antigène CD81, bien qu'il ne soit pas spécifique de la lignée B, est exprimé sur tous les lymphocytes B depuis un stade très précoce. Il est associé à la surface cellulaire avec le CD19 et le CD21 dans le complexe de signalisation des cellules B.

L'antigène CD10 (CALLA) est exprimé par les précurseurs B et les centrocytes, mais pas par les cellules B mûres circulantes. Il s'agit d'une endopeptidase neutre, mise en jeu dans la régulation de la maturation des lymphocytes B.

Les molécules du système HLA de classe II (HLA, human leukocyte antigen ou CMH, complexe majeur d'histocompatibilité) sont exprimées de façon constitutive par toutes les cellules B. Elles interviennent dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T [7].

2.2 L'immunophénotypage plasmocytaire.

Il est important de souligner l'hétérogénéité du phénotype des plasmocytes d'un individu à l'autre et chez un même individu.

2.2.1 Marqueurs B

La différenciation plasmocytaire s'accompagne de la diminution puis de la perte d'expression de :

L'Ig de surface membranaire, elle peut alors être détectée en intra cytoplasmique,

La structure de transduction du signal du BCR, le complexe CD79a/b.

Les CD20, CD21, CD22 et CD23, ainsi que le HLA de classe II [8].

Enfin, si les plasmoblastes sont CD40+, l'expression de cet antigène est perdue par les cellules plasmocytaires matures [5,6].

En revanche, les cellules de la lignée plasmocytaire conservent l'expression de l'antigène CD19, néanmoins elle est plus faible que celle des cellules B. Notons aussi qu'une sous-population de cellules plasmocytaires peut ne pas exprimer ce marqueur [5,7]. Jegou et al ont en effet, caractérisé des cellules plasmocytaires très proliférantes (plasmablastes), au phénotype immature CD19-.

L'antigène CD27, marqueur des lymphocytes B mémoires, est exprimé par les cellules plasmocytaires, quel que soit leur stade de maturation ainsi que le CD81.

2.2.2 Marqueurs de la lignée plasmocytaire.

Les deux marqueurs phénotypiques caractéristiques de la lignée plasmocytaire sont le CD38 et le CD138 [8,9]. L'antigène CD38 est une glycoprotéine transmembranaire présentant les fonctions de pléiotropie d'une ectoenzyme, avec comme substrat le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) ou l'ADP (adénosine diphosphate) ribose cyclique. Elle pourrait aussi fonctionner comme un récepteur, pour médier l'adhésion des cellules à l'endothélium vasculaire et intervenir dans les voies d'activation cellulaire. Notons que le CD38 ne constitue pas un marqueur spécifique de la lignée plasmocytaire. Il est notamment exprimé de façon ponctuelle au cours de la différenciation B (lymphocytes pro-B et cellules centro germinatives).

L'antigène CD138 (syndecan-1) est un protéoglycane de la famille des héparanes sulfates.

Dans les cellules hématopoïétiques humaines, son expression est restreinte aux plasmocytes. Il est également exprimé par les cellules épithéliales, mésenchymateuses et carcinomateuses. Le syndecan-1 possède un long domaine extracellulaire qui se lie à des molécules solubles (facteurs de croissance) et insolubles de la matrice extracellulaire ou du cytosquelette (collagène, fibronectine). Il intervient ainsi dans l'activité des facteurs de croissance, la mobilité cellulaire et le contrôle de la morphologie des cellules. Les études de la différenciation plasmocytaire montrent que le CD138 peut aussi être considéré comme un antigène de différenciation. En effet, son expression apparaît après le stade de plasmablaste. Les plasmablastes CD138- se différencient en précurseurs plasmocytaires CD138+ gardant une

certaine capacité de prolifération, avant la maturation finale en plasmocytes CD138+++, qui ne se divisent plus [5,6].

2.2.3 Autres marqueurs phénotypiques.

L'antigène CD45 est une tyrosine phosphatase largement exprimée par les cellules hématopoïétiques. Les plasmocytes des ganglions et du sang périphérique, hautement proliférant, présentent un phénotype homogène CD45 fort. Au contraire, la population plasmocytaire médullaire est globalement CD45+ mais présente une relative hétérogénéité. Il a été montré que l'expression de CD45 diminue au cours de la différenciation des cellules plasmocytaires, parallèlement à la maturation et à l'arrêt de la prolifération cellulaire [10]. Le CD221, récepteur de l'IGF-1 (IGF-1R) est détecté à un faible niveau, dans un peu moins de la moitié des plasmocytes médullaires, mais pas dans ceux des ganglions [12]. Cette observation suggère que CD221 pourrait être spécifiquement surexprimé lors du homing des plasmocytes dans le microenvironnement médullaire.

3. PHYSIOPATHOLOGIE

Depuis plusieurs années, différents aspects concernant la physiopathologie du MM ont été identifiés, en particulier le rôle de l'environnement médullaire dans la survie, la prolifération des plasmocytes tumoraux, les molécules d'adhésion, les cytokines et chemokines, l'angiogenèse, les mécanismes de l'ostéopathie associés au myélome et enfin celui de l'oncogenèse.

3.1 Le rôle de l'environnement médullaire

Les plasmocytes malins et les plasmocytes normaux, se localisent dans la moelle osseuse où ils entretiennent une communication étroite avec les cellules de l'environnement médullaire qui est essentielle pour la progression de la maladie.

Dans la moelle osseuse, ils coexistent et interagissent avec des cellules stromales, les protéines de la matrice extracellulaire, les ostéoblastes, les ostéoclastes, les cellules endothéliales, les monocytes, les polynucléaires et les lymphocytes. Pour se développer, les plasmocytes malins nécessitent un environnement médullaire favorable dans lequel les cytokines, principalement l'interleukine 6, jouent un rôle essentiel.

3.2 La prolifération des plasmocytes tumoraux

Les interactions des plasmocytes malins avec le microenvironnement permettent le recrutement de nouveaux plasmocytes au sein de la moelle et créent un environnement optimal pour la survie et la prolifération des plasmocytes malins.

3.3 Les molécules d'adhésion

L'adhésion au stroma médullaire et les interactions avec les cellules qui le composent sont indispensables pour le homing, la croissance et la survie des plasmocytes tumoraux. Elles concourent au maintien du caractère prolifératif et anti-apoptotique. Elles appartiennent globalement à quatre familles [11,12] représentées par les $\beta 1$ intégrines, dont CD49a/CD29 ou VLA-1 ($\alpha 1\beta 1$ -intégrine), CD49d/CD29 ou VLA-4($\alpha 4\beta 1$ -intégrine) et CD49e/CD29 ou VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$ -intégrine), les $\beta 2$ intégrines, dont CD11a/CD18 ou LFA-1 ($\alpha 1\beta 2$ -intégrine), les protéoglycanes, comme CD138 et CD44 et les molécules de la superfamille des Ig, comme le CD56 (NCAM, neural cell adhesion molécule) et les ICAMs.

3.4 Cytokines et chemokines

Les plasmocytes malins expriment le récepteur CXCR4 de la chemokine SDF-1. Le MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1) attire les cellules myélomateuses qui portent le récepteur CCR2 dans la moelle osseuse. Deux facteurs ont été identifiés comme ayant un rôle majeur dans la physiopathologie de la maladie: L'IL-6 (Interleukine 6) et l'IGF-1(insulin growth factor-1). L'IL-6 est un facteur de croissance et de survie essentielle des plasmocytes malins. Les plasmocytes malins sont capables de produire cette cytokine de façon autocrine. Néanmoins, ce sont les cellules stromales médullaires, ainsi que les ostéoblastes et les ostéoclastes, qui constituent la principale source d'IL-6 dans le MM, sous la dépendance des interactions entre les plasmocytes et le microenvironnement médullaire [14]. La synthèse de l'IL-6 est notamment induite par l'Interleukine 1 β (l'IL-1 β) et le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), libérés par les plasmocytes malins. Quant à l'IGF-1, il contribue à la prolifération des plasmocytes malins grâce à ses propriétés anti apoptotiques.

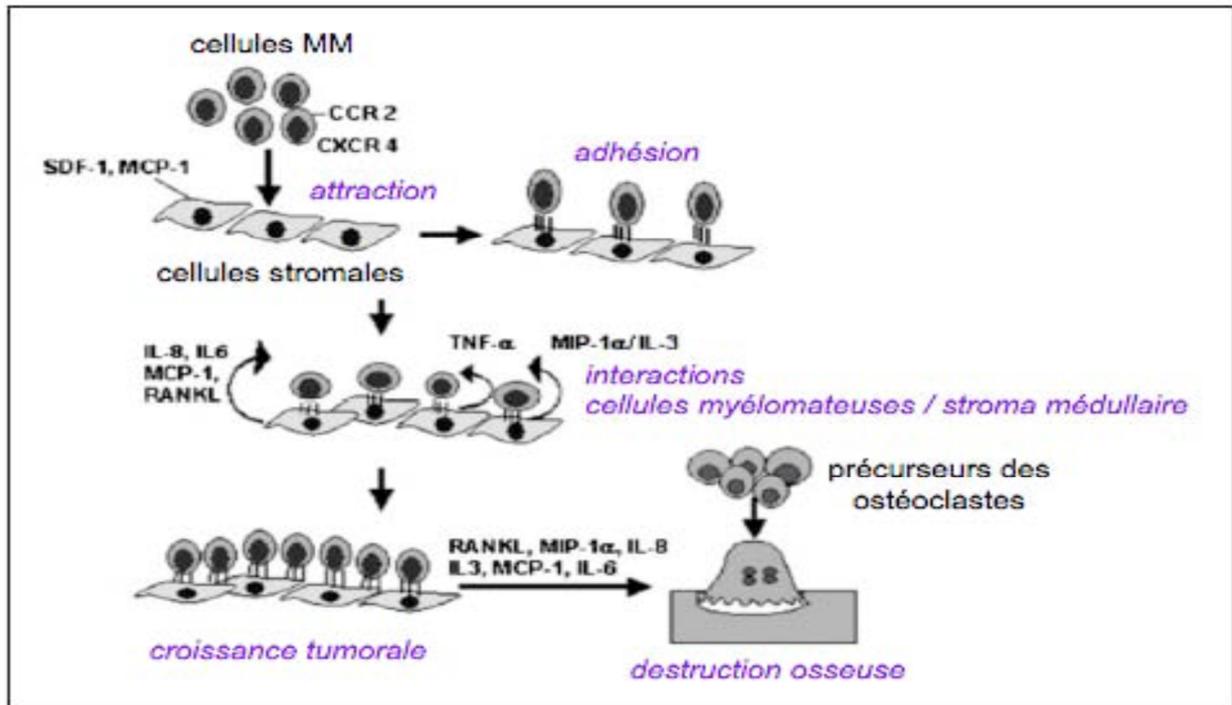


Figure 1 : Rôle des principales cytokines et chemokines dans la physiopathologie du myélome multiple [15]. MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MIP-1 α , macrophage inflammatory protein-1 α ; MM, myélome multiple; RANKL, receptor activator for nuclear factor kappa b ligand; SDF-1, stromal cell-derived factor-1; TNF- α , tumor necrosis factor- α . [13]

3.5 Angiogenèse

L'angiogenèse est une étape essentielle dans la progression tumorale. La survie et la prolifération des cellules malignes nécessitent en effet une vascularisation. Les plasmocytes malins synthétisent du VEGF (vascular endothelial growth factor), facteur de croissance, qui stimule l'angiogenèse locale et dont les récepteurs sont exprimés par les cellules stromales médullaires et les cellules myéloïdes et monocytaires. Les cellules stromales répondent au VEGF par une forte augmentation de la synthèse d'IL-6, et en retour l'IL-6 induit une augmentation de la synthèse du VEGF par les plasmocytes malins. Ces stimulations réciproques de la synthèse de VEGF et d'IL-6 sont responsables d'une angiogenèse accrue et d'une stimulation de la croissance tumorale.

3.6 Mécanismes de l'ostéopathie associée au myélome

L'ostéolyse associée au MM est la conséquence d'une augmentation de l'activité de résorption ostéoclastique à proximité des plasmocytes tumoraux. Elle est liée à une augmentation du recrutement, de la différenciation des ostéoclastes et de leur activité de résorption associée à une inhibition de la formation osseuse.

3.6.1 Augmentation de la résorption osseuse

L'activité ostéoclastique est augmentée de façon marquée dans le MM, sous l'effet de diverses cytokines et chemokines produites par les plasmocytes malins, ou par les cellules stromales, stimulées par les plasmocytes malins. Plusieurs molécules ont été identifiées, dont le RANK et le RANK-ligand (RANK-L, receptor activator for nuclear factor kappa b ligand), l'ostéoprotégérine, MIP-1 α , l'IL-6, l'IL-3 ainsi que MCP-1, IL-8 et SDF-1.

3.6.2 Diminution de l'activité ostéoblastique

L'activité ostéoblastique est fortement diminuée dans le MM, sous l'influence de divers inhibiteurs de la différenciation des ostéoblastes, comme l'IL-3 et l'IL-7, ainsi que le Dickkopf (DKK1), produit par les plasmocytes malins. Le DKK1 est un inhibiteur de la voie de signalisation et joue un rôle important dans l'ostéogénèse [12, 14,15].

3.7 Oncogénèse

La nature exacte de la cellule à l'origine du MM reste mal connue. Elle est vraisemblablement, comme c'est le cas pour de nombreuses tumeurs de type B, post-centro germinative, c'est-à-dire postérieure aux événements de mutations somatiques, de sélection et de commutation isotypique. En effet, la protéine monoclonale impliquée est en général une immunoglobuline de type IgG dans 60% des cas ou une IgA dans 20% des cas, très rarement une IgD dans 1 à 2% des cas et exceptionnellement une IgM. L'expression d'une Ig commutée constitue un argument fort en faveur du caractère post-centro germinatif de la cellule [6].

Il existe, chez un même patient, des populations de plasmocytes malins de différents degrés de maturité. Il est probable que la fraction la plus immature de ces cellules, qui est la fraction proliférante, soit capable d'auto-renouveau et soit ainsi responsable de l'expansion du clone malin. L'existence d'un stade de plasmablastes hautement proliférant au cours de la différenciation plasmocytaire physiologique est en faveur de cette hypothèse. Ainsi, la majorité des plasmocytes malins ne constituent pas un compartiment de cellules tumorales prolifératives mais un compartiment d'accumulation de cellules plasmocytaires matures, alimenté par un petit compartiment de cellules tumorales prolifératives immatures (plasmablastes).

La cause de la prolifération plasmocytaire maligne n'est pas connue, mais une instabilité génétique est vraisemblablement impliquée, se manifestant par des erreurs au cours des modifications spécifiques de l'ADN des cellules B que sont la recombinaison de VDJ (jonction des gènes V de part et d'autre des gènes D et en amont (en 5') des gènes J), le switch de classe d'Ig, ou l'hypermutation somatique. Ces erreurs peuvent conduire à des réarrangements chromosomiques dont la résultante est une activité cellulaire anormale traduisant la malignité.

Deux situations semblent associées à une incidence plus élevée de MM, une stimulation antigénique chronique, comme dans les cas d'infections chroniques, ainsi que l'exposition à des substances toxiques (pesticides, benzène, solvants organiques, dérivés du pétrole) ou des radiations ionisantes. Cependant, la plupart des patients atteints de MM ne présentent aucune de ces caractéristiques et leur place réelle dans l'oncogénèse reste difficile à évaluer avec précision.

Finalement, les étapes d'apparition du myélome pourraient être la stimulation antigénique, la sélection d'un clone anormal, l'expansion de ce clone et la progression vers la malignité à la suite d'événements génétiques comme l'activation d'oncogènes.

3.8 Conséquences physiopathologiques liées à l'immunoglobuline monoclonale

3.8.1 La néphropathie ou rein myélomateux

Pour permettre une conformation correcte de l'Ig, le plasmocyte produit un excès de chaînes légères par rapport aux chaînes lourdes. Des chaînes légères libres (CLL) sont donc produites en conditions physiologiques et sont rapidement épurées et métabolisées par le rein, filtrées au niveau glomérulaire, réabsorbées par le tubule proximal et finalement sécrétées par les muqueuses du tubule distal. Les plasmocytes tumoraux produisent une Ig monoclonale en grande quantité. Elle est soit complète, soit formée seulement d'une chaîne légère. Dans les deux cas, la quantité de CLL est anormalement élevée chez les patients atteints de MM. Lorsque ces CLL en quantités excessives atteignent le rein et passent dans les glomérules, la capacité d'absorption des tubules proximaux est dépassée. Les CLL entrent alors dans les tubules distaux et précipitent sous forme de cylindres hyalins, conduisant à une obstruction tubulaire. Les CLL ont également une action tubulotoxique propre responsable d'une atrophie de l'épithélium. Enfin, d'autres facteurs sont susceptibles de concourir à l'atteinte rénale associée au MM, tels qu'une amylose, des dépôts d'Ig monoclonale, la surcharge calcique, une cryoglobulinémie [4,6].

3.8.2 Le syndrome d'hyperviscosité

Le syndrome d'hyperviscosité survient lorsque le taux de l'Ig monoclonale dans le sang est très important. Ce syndrome peut donc être observé dans le MM, plus particulièrement dans les MM à IgA, puisque ces molécules ont tendance à polymériser, ou dans les rares MM à IgM. Cependant, il s'agit d'un événement très rare au cours du MM.

3.8.3 L'amylose

La substance amyloïde est composée de chaînes légères d'Ig. Elle peut entraîner des lésions rénales isolées ou être diffuse, touchant la peau, le cœur, le tube digestif, la langue, les muscles, le système nerveux.

3.8.4 Activité anticorps

L'Ig myélomateuse peut être douée d'une activité anticorps, de type anticoagulant circulant, anti-streptolysine O ou anti-lipoprotéine, qui va enrichir la symptomatologie.

3.9 Conséquences physiopathologiques liées aux cytokines IL6 et TNF

3.9.1 Susceptibilité aux infections

La défense de l'organisme contre les infections est totalement conditionnée par la présence de la lignée plasmocytaire, et plus précisément par l'intégrité des plasmocytes, puisque ce sont eux qui assurent l'immunité humorale par la production d'anticorps.

Chaque pathogène présentant un ensemble d'antigènes entraîne une stimulation antigénique toujours poly clonale. Chaque clone de plasmocytes, produit des anticorps spécifiques d'un antigène et ces anticorps appartiennent à différentes classes d'Ig. Lorsqu'une cellule plasmocytaire est transformée, il peut en résulter une prolifération illimitée d'un seul clone.

C'est ce qui se passe dans le MM. L'Ig produite est monoclonale, caractérisée par son homogénéité, à l'opposé de l'extrême hétérogénéité des Ig physiologiques. Elle est mono-spécifique (identité des régions variables des chaînes lourdes et légères) et ne contribue pas à la défense immunitaire. En outre, la prolifération plasmocytaire maligne s'accompagne d'une inhibition de la lymphopoïèse B normale, d'où, une dépression de la synthèse des Ig normales, à laquelle s'associent des anomalies de la réponse anticorps et des anomalies des cellules T (diminution des CD4, augmentation des CD8).(6)

3.9.2 Cytopénies

La sécrétion des cytokines est responsable d'une inhibition de l'hématopoïèse se traduisant par des cytopénies. La physiopathologie de l'anémie associe un syndrome inflammatoire, une inhibition de l'érythropoïèse (sous l'action du TNF et de l'IL-1), l'insuffisance rénale (déficit en érythropoïétine), et l'insuffisance de production de la lignée érythrocytaire, du fait de l'envahissement médullaire par les plasmocytes tumoraux. Les anémies d'origine carencielle ou hémolytique sont rares au diagnostic. Notons aussi qu'une hémodilution, conséquence des fortes protidémies observées dans le MM, peut majorer l'anémie. Plus rarement, l'altération de l'hématopoïèse due à l'envahissement médullaire est responsable d'autres cytopénies, voire d'une pancytopénie, surtout dans les MM en fin d'évolution.

3.9.3 Lyse osseuse

L'activité accrue des ostéoclastes est responsable d'une destruction osseuse, responsable de fractures pathologiques en particulier au niveau des zones d'appui comme le bassin mais également au niveau des côtes.

4. ÉPIDÉMIOLOGIE

En Europe et aux USA le MM est une affection relativement rare, avec une incidence annuelle de 0,98 pour 100.000 habitants [18]. Il représente 1% des cancers et 10 à 15% des hémopathies malignes [18]. En Algérie l'incidence est estimée à 1,1 pour 100.000 habitants(19).

Cette pathologie touche l'adulte après 40 ans et l'incidence augmente rapidement avec l'âge.

La médiane d'âge au diagnostic se situe autour de 65 ans [16-18]. Si la survenue de cette hémopathie chez les jeunes adultes est exceptionnelle, en Algérie plus de la moitié des patients ont moins de 65 ans [21]. Le MM touche un peu plus fréquemment les hommes que les femmes, environ 1,4 homme pour 1 femme [22].

5. CLINIQUE

Le myélome multiple est une maladie très polymorphe. Toutes les disciplines médicales peuvent être confrontées aux manifestations d'un myélome méconnu telle la traumatologie, la neurologie, la néphrologie, la rhumatologie ou l'hématologie. Les éléments cliniques qui caractérisent le MM peuvent être présents dès le diagnostic ou apparaître au cours de l'évolution de la maladie. Ils comprennent des symptômes généraux, non spécifiques mais habituels et précoces, tels qu'une altération de l'état général, une asthénie qui constitue un symptôme majeur trouvé chez environ 30% des patients et souvent liée à un syndrome anémique et enfin une perte de poids modeste observée chez environ un quart des patients. À côté de cela, le MM se révèle par des symptômes plus spécifiques, intéressant en priorité le squelette.

5.1 Douleurs osseuses

Les douleurs osseuses sont fréquemment révélatrices du MM et concernent environ 70 % des patients au moment du diagnostic. Elles sont tenaces et rebelles aux antalgiques usuels. Elles sont localisées principalement au rachis et aux côtes. Des tumeurs osseuses peuvent également être retrouvées.

5.2 Atteinte rénale

L'insuffisance rénale est une cause majeure de morbidité et également de mortalité chez les patients atteints de MM. Au diagnostic, plus de 50% des patients présentent une atteinte rénale, 12 à 20% ont une insuffisance rénale aigüe et 10% d'entre eux deviennent dialyse dépendant [23].

L'atteinte rénale du MM est principalement liée à une néphropathie tubulo-interstitielle par précipitation intra-tubulaire de CLL (rein myélomateux). Cela explique qu'elle soit observée plus fréquemment dans les MM à chaînes légères. Cliniquement, la tubulopathie myélomateuse

se présente comme une insuffisance rénale de constitution progressive, à diurèse conservée. Elle est souvent aggravée par une déshydratation (fièvre, vomissements), une infection, des traitements médicamenteux et notamment l'administration intraveineuse de produits iodés, ou encore l'hypercalcémie, autant de facteurs qui favorisent la précipitation intra-tubulaire des chaînes légères d'Ig. Elle peut alors se présenter sous forme d'une insuffisance rénale oligo-anurique.

5.3 Manifestations neurologiques

Il s'agit le plus souvent d'une compression médullaire, au niveau de la gaine nerveuse par la prolifération plasmocytaire, par contiguïté liée à l'atteinte osseuse et ou par une vertèbre fracturée. La compression médullaire se traduit cliniquement par des signes radiculaires puis une paraplégie nécessitant, après une imagerie par résonance magnétique (IRM), un traitement chirurgical d'urgence.

On peut également observer des neuropathies sensitivomotrices souvent associées à un plasmocytome localisé ostéocondensant ou à une amylose.

Enfin, d'autres symptômes neurologiques comme des troubles de la vision, des bourdonnements d'oreille ou une confusion peuvent accompagner le MM, en relation avec des désordres métaboliques généraux (hypercalcémie, hyperazotémie, hyperviscosité).

5.4 Amylose AL

Elle est retrouvée dans environ 10% des cas et en particulier au cours des MM à IgD et à chaînes légères lambda. Elle se traduit cliniquement par une macroglossie, une insuffisance rénale, cardiaque, une pseudo-hypertrophie musculaire [24].

Parmi les autres manifestations rencontrées, citons le syndrome du canal carpien, les neuropathies périphériques (sensitives puis motrices), la neuropathie autonome avec hypotension orthostatique, l'atteinte cutanée avec purpura et nodules (face et tronc), l'arthropathie amyloïde, l'hépatomégalie et l'atteinte du tractus gastro-intestinal (malabsorption, perforations, hémorragies, occlusion [25]).

5.5 Complications infectieuses

Le MM s'accompagne d'un déficit de l'immunité, responsable de l'apparition de complications infectieuses fréquentes et sévères, souvent causes de décès. Elles sont le plus souvent bactériennes, respiratoires dans 50% des cas liées au streptococcus pneumonie, au staphylococcus aureus, à l'Haemophilus influenzae. Elles peuvent être rénales dans 30% des cas, liées à l'Escherichia coli, le Pseudomonas, le Proteus ou le Klebsiella, ou systémiques dans 8% des cas[6].

5.6 Syndrome d'hyperviscosité

Cliniquement, l'hyperviscosité retrouvée au cours du MM se manifeste par une asthénie, des étourdissements, des troubles de la vision, des bourdonnements d'oreilles. Il peut également se manifester par des symptômes neurologiques à type de céphalées, de vertiges, d'acouphènes mais aussi d'une ataxie, de chorées, de déficits neurologiques focaux, voire de troubles de la conscience allant jusqu'au coma [26]. Des convulsions, secondaires à des hémorragies intracérébrales ou des neuropathies périphériques, liées à l'occlusion de petits vaisseaux, sont plus rares.

5.7 Autres manifestations

L'immunoglobuline peut aussi avoir une propriété de cryoglobuline et être responsable d'un acrosyndrome, d'un purpura vasculaire et de polyarthralgies.

Le clone plasmocytaire malin peut également atteindre des sites extra-osseux, avec notamment des localisations hépatiques, spléniques, ganglionnaires, digestives ou pleuropulmonaires.

6. RADIOLOGIE

6.1 Radiologie conventionnelle

La radiologie standard est la technique de référence pour l'exploration de l'atteinte osseuse associée au MM. Le bilan radiologique comprend des clichés du crâne, du rachis complet, du bassin, du thorax et des grils costaux, sans oublier les os longs (humérus et fémurs). Il existe des lésions radiologiques dans près de 70% des cas au diagnostic et 80% des cas dans les MM évolués [17]. L'aspect radiologique des lésions est généralement celui de lacunes bien circonscrites, sans condensation périphérique, dites à l'emporte-pièce. L'atteinte osseuse peut aussi se manifester sous forme de fractures, de tassements, de tuméfactions osseuses, ou encore d'une déminéralisation osseuse diffuse pouvant simuler une ostéoporose. Les aspects de condensation sont très rares.

6.2 Scintigraphie osseuse

La scintigraphie osseuse n'a aucun intérêt car les lésions associées au MM sont purement lytiques.

6.3 La tomодensitométrie

La TDM (tomodensitométrie) peut être nécessaire pour définir des lésions osseuses en cas de douleurs sans signes radiologiques patents [18]. Cette technique est plus sensible que la radiographie pour détecter un envahissement osseux.

6.4 Imagerie par résonance magnétique

L'IRM de diffusion corps entier avec injection de gadolinium permet de faire une cartographie des infiltrations myélomateuses et de mieux suivre l'action des nouvelles thérapies. L'IRM est aussi essentielle si l'on suspecte une compression médullaire.

6.5 Tomodensitométrie par émission de positrons (TEP Scanner)

Il s'agit d'une imagerie qui a un double impact, diagnostique dans certains cas particuliers et pronostic. En effet, plusieurs études ont montré que l'évaluation par la TEP, avait un impact pronostic en termes de PFS et d'OS [27]. Par ailleurs, la TEP est aujourd'hui utilisée dans l'évaluation de la maladie résiduelle. La négativation de la TEP, rapportée dans plusieurs études, est considérée comme un marqueur de MRD et fait désormais partie des nouveaux critères de réponse définis par l'International Myeloma Working Group (IMWG).

7. BIOLOGIE

L'exploration du MM comprend diverses analyses biologiques, indispensables au diagnostic, à l'évaluation du pronostic, à la décision thérapeutique (recherche des facteurs de gravité et de comorbidités associées) ainsi qu'au suivi de la pathologie et notamment l'évaluation de la réponse au traitement.

7.1 Détection et quantification de l'Ig monoclonale

Sauf s'il est non sécrétant et ce dans de très rares cas, où aucune synthèse et/ou sécrétion d'Ig n'a lieu, le MM est caractérisé par la présence d'une Ig monoclonale dans le sérum et/ou dans les urines. La prolifération d'un seul clone plasmocytaire se traduit en effet par la synthèse en grande quantité d'une Ig présentant une identité immunologique et également une identité de charge électrique et de structure, à la base de sa mise en évidence et de sa caractérisation.

Les Ig monoclonales sont recherchées dans le sérum et les urines, parfois aussi dans les liquides de ponction.

7.1.1 Analyse du sérum

L'étude des protéines sériques fournit des informations non seulement sur le composant monoclonal (Mn) mais aussi sur la production diminuée des Ig polyclonales physiologiques et de l'albumine.

7.1.1.1 Dosage des protéines sériques totales

Cet examen de base, non spécifique, permet d'évoquer l'existence d'une gammopathie monoclonale en mettant en évidence une hyperprotidémie importante, souvent supérieure à 100 g/L, atteignant parfois 120 à 130 g/L. L'hyperprotidémie reflète l'augmentation de la

masse protéique circulante dans le MM. Cependant, notons qu'une hypoprotidémie est souvent trouvée dans les MM à chaînes légères.

7.1.1.2 Electrophorèse des protéines

La recherche d'une Ig monoclonale nécessite une analyse des protéines sériques par électrophorèse (EPS). La présence d'une gammopathie monoclonale est illustrée par une bande étroite et dense due à la mobilité électrophorétique homogène du composant Mn par sa charge électrique. Il s'agit d'un pic étroit sur le tracé électrophorétique, migrant le plus souvent dans la zone des γ - globulines, mais aussi parfois des β voire des α_2 globulines. Cependant, le pic monoclonal est parfois absent ou discret lorsque le composant Mn a un poids moléculaire suffisamment faible pour franchir le filtre glomérulaire rénal. C'est le cas dans 15 à 20% des MM qui ne sécrètent que des CLL (myélomes à chaînes légères) [28].

Le tracé électrophorétique permet également de déterminer une éventuelle hypoalbuminémie associée (l'albuminémie est inférieure à 30 g/L dans 15 % des cas) [28,6] ou encore la présence d'une hypogammaglobulinémie.

7.1.1.3 Immunofixation ou immunoélectrophorèse des protéines sériques

Une immunoélectrophorèse (IEP) ou une immunofixation (IF) est réalisée devant toute anomalie de l'électrophorèse (pic monoclonal, hypogammaglobulinémie) ou devant la présence de symptômes cliniques évocateurs. L'Ig monoclonale ne possède qu'un seul type de chaîne lourde et un seul type de chaîne légère. En ce qui concerne les chaînes légères, elles sont de type κ dans environ deux tiers des cas et λ dans environ un tiers des cas [29]. Quant aux chaînes lourdes, il s'agit le plus souvent de chaînes γ dans les MM à IgG qui représentent un peu plus de 50% des cas. Dans environ 20% des cas c'est une chaîne lourde α dans les MM à IgA. Plus rarement, il s'agit d'une chaîne μ dans les MM à IgM, δ dans les MM à IgD (1 à 2% des cas) ou exceptionnellement ϵ (MM à IgE) [4,6,22].

7.1.1.4 Dosage pondéral des Ig dans le sérum

Le dosage pondéral des Ig par néphélométrie ou immunodiffusion radiale apprécie l'éventuelle baisse des autres classes d'Ig qui est observée dans 90% des cas [28]. Le taux d'Ig physiologique renseigne sur les risques infectieux encourus par le patient.

7.1.2 Analyse des urines

Un recueil des urines de 24 heures est nécessaire pour la détermination de la quantité totale de protéines excrétées par jour. Une protéinurie significative, souvent supérieure à 1 gramme par 24 heures, peut évoquer l'existence d'un passage de CLL monoclonales dans les urines que l'on nomme protéinurie de Bence Jones (PBJ). Cependant, la protéinurie seule n'a pas de signification. Elle doit être complétée par une analyse qualitative des protéines urinaires par

électrophorèse (EPU, électrophorèse des protéines urinaires), après concentration d'un échantillon des urines de 24 heures.

Au cours du MM à chaînes légères, la recherche de PBJ par électrophorèse est capitale car le pic sérique est souvent absent sur le tracé électrophorétique. L'IEP ou l'IF identifient la nature de la chaîne légère. Notons que la plupart des bandelettes urinaires utilisées pour la recherche de protéinurie ne mettent en évidence que l'albumine et ne détectent pas les chaînes légères d'Ig.

7.1.3 Intérêt du dosage des chaînes légères libres sériques

La production anormale (monoclonale) de CLL dans le MM est détectée par les modifications du rapport $CLL\kappa/CLL\lambda$. Des concentrations élevées des deux types de CLL avec un rapport κ/λ normal peuvent être attribuées à une insuffisance rénale ou une surproduction de CLL polyclonales lors d'un état inflammatoire. Des concentrations élevées des deux types de CLL avec un rapport κ/λ anormal laissent supposer une gammopathie monoclonale, associée ou non à une insuffisance rénale [30].

La sensibilité du test est annoncée à 2 mg/l, ce qui le rend plus sensible que l'immunofixation (50 à 300 mg/l). Les recommandations internationales positionnent le dosage sérique des CLL comme une alternative à l'analyse de la PBJ lors du dépistage des gammopathies monoclonales. Pour le suivi quantitatif des patients atteints de MM, il ne peut pas remplacer l'électrophorèse des protéines, sauf dans le cas des patients pauci ou oligo-sécrétants, ainsi que chez les deux tiers des patients dits non sécrétant et pour lesquels le dosage des CLL sériques s'avère un progrès remarquable.

7.2 Autres paramètres biochimiques

7.2.1 Créatininémie

L'atteinte de la fonction rénale dans le MM est évaluée par l'augmentation de la créatininémie. Celle-ci est supérieure à 175 $\mu\text{mol/l}$ (20 mg/l) dans au moins 20% des cas au diagnostic et deux fois plus fréquemment dans les formes évoluées de la maladie [28].

7.2.2 Paramètres métaboliques

Des perturbations du métabolisme phosphocalcique reflètent l'ostéolyse induite par les plasmocytes malins. On peut ainsi observer une hypercalcémie (calcémie supérieure à 110 mg/l soit 2,75 mmol/l) dans 10% à 30% des cas [28].

Moins fréquemment le MM peut s'accompagner d'une hyperuricémie.

7.2.3 Vitesse de sédimentation globulaire

La vitesse de sédimentation (VS) est accélérée dans la majorité des cas de MM, supérieure à 20 mm à la première heure et souvent supérieure à 100 mm [18]. Notons que si ce paramètre est

normal dans un contexte de MM (10% des cas), il faut penser à un MM à chaînes légères ou à un MM non sécrétant [13]. En effet, l'accélération de la VS reflète un déséquilibre protidique (hyperprotidémie). Il s'agit d'un examen non spécifique, modifié, en présence d'un syndrome inflammatoire ou d'une hypergammaglobulinémie polyclonale importante et est également influencé par l'anémie.

7.2.4 Protéine C réactive

La protéine C réactive (CRP, C réactive protéine) est un marqueur de l'activité du MM. En effet, au cours de cette hémopathie, l'IL-6 est produite en grande quantité par le microenvironnement tumoral (cellules stromales) et par les plasmocytes eux-mêmes, constituant le facteur de croissance essentiel de la prolifération des cellules myélomateuses. Or, l'IL-6 stimule également la synthèse hépatique de la CRP. Cette dernière est ainsi fréquemment augmentée dans le MM. Cependant, ce n'est pas un marqueur spécifique de l'activité de la maladie myélomateuse, car cette protéine de la phase aiguë de l'inflammation peut être augmentée par de nombreux autres facteurs.

7.2.5 β 2-microglobuline sérique et lactate déshydrogénases

La β 2-microglobuline sérique reflète l'importance de la masse tumorale. Néanmoins, son élévation doit toujours être interprétée en fonction de l'état de la fonction rénale.

L'augmentation du taux de LDH (lactate déshydrogénases) signe le caractère prolifératif de la pathologie tumorale. Les LDH sont augmentées chez 15% à 20% des patients atteints de MM [13].

7.3 Hémogramme

La prolifération plasmocytaire médullaire retentit sur l'hémogramme à travers divers paramètres. Une anémie (hémoglobine inférieure à 12 g/dl) est présente dans près de 70% des cas au diagnostic, et chez quasiment tous les patients dans les formes évoluées [18], [28]. Elle est généralement modérée en intensité, autour de 10 g/dl, mais peut être importante, hémoglobine inférieure à 8 g/dl, dans plus ou moins 10% des cas selon les études [28]. Elle est normochrome normocytaire, parfois macrocytaire, arégénérative.

Une thrombopénie inférieure à 100 G/l est observée dans 5% des cas au diagnostic et plus fréquemment dans les formes évoluées de la maladie [28]. L'apparition d'une thrombopénie reflète généralement un degré important d'infiltration médullaire. Une neutropénie est également possible, mais rare, dans les stades tardifs de la pathologie.

Le nombre de lymphocytes est normal ou parfois diminué. Le passage des plasmocytes malins dans la circulation sanguine est rare. Néanmoins, dans 2% des MM au diagnostic, les plasmocytes représentent plus de 20% des cellules du sang circulant, ou plus de 2 G/l,

définissant la leucémie à plasmocytes (PCL : plasma cell leukemia) primitive. Lorsque cette plasmocytose sanguine importante est observée au cours de l'évolution du MM (2% des cas de MM également), on parle de PCL secondaire.

Enfin, notons que l'observation du frottis sanguin montre des globules rouges en rouleaux. Ce phénomène est dû à l'hypergammaglobulinémie et est lié à l'accélération de la VS. Il est observé chez plus de 60% des patients atteints de MM [28].

7.4 Myélogramme

Le MM est une pathologie avant tout de la moelle osseuse. Le myélogramme tient donc logiquement une place prépondérante dans l'exploration biologique de cette hémopathie. Au cours du MM, la moelle osseuse est généralement de richesse normale, parfois augmentée si l'envahissement plasmocytaire est massif et quelquefois diminuée [6].

7.4.1 Plasmocytose médullaire

Dans la moelle osseuse normale, les plasmocytes représentent moins de 0,5% des éléments nucléés. Ce contingent est augmenté dans le MM, dans la plupart des cas supérieur à 10%, et pouvant atteindre 90% voir plus [28]. Notons que la plasmocytose médullaire peut également être augmentée dans d'autres situations, comme lors d'infections chroniques ou de maladies auto-immunes. L'infiltration plasmocytaire médullaire dans le MM n'est pas forcément homogène. Les plasmocytes tumoraux s'agrègent pour former des colonies (ou clusters). Le pourcentage de plasmocytes peut donc varier de façon significative selon le site d'aspiration et parfois même la moelle paraît normale. Il peut alors être nécessaire de refaire la ponction de moelle dans un autre territoire, ou de réaliser une biopsie osteomédullaire (BOM).

7.4.2 Morphologie plasmocytaire

La morphologie des plasmocytes malins est très variable. Elle peut être proche de la forme non tumorale ou, au contraire, s'en distinguer très nettement. De nombreuses anomalies peuvent être observées, mais elles ne sont pas indispensables au diagnostic.

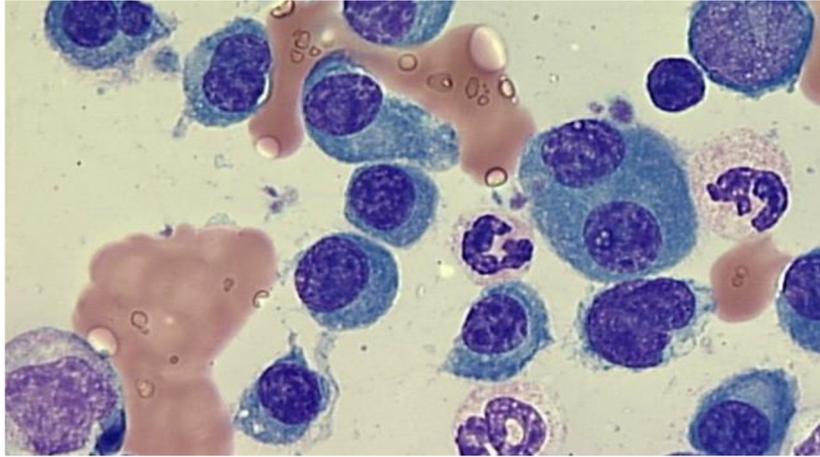


Figure2 Morphologie plasmocytaire

Dr Luc Montfort Myélome multiple Actualisations thérapeutiques

7.4.3 Autres lignées cellulaires

Les autres lignées cellulaires peuvent être diminuées en fonction de l'importance de l'envahissement plasmocytaire. De discrets signes de dysgranulopoïèse (quelques granulocytes hypogranuleux) peuvent être observés. Une dysérythropoïèse peut également être observée (cytoplasmes lacunaires, quelques mégalo blasts), d'étiologie mixte, inflammatoire et par carence en folates. Un syndrome myélodysplasique vrai peut être associé à un MM au diagnostic (1 à 2% des cas) ou en fin d'évolution de la pathologie.

7.5 Cytogénétique

La cytogénétique conventionnelle (caryotype), qui n'analyse que des cellules en cours de division, a longtemps sous-estimé la fréquence des anomalies génétiques rencontrées dans le MM. Le développement des techniques de FISH (hybridation in situ par fluorescence), qui s'appliquent aussi bien aux cellules en métaphase qu'en interphase, a montré que des anomalies génétiques sont retrouvées chez une grande majorité des patients (plus de 90%), environ trois fois plus fréquemment qu'avec les techniques conventionnelles [31]. Par ailleurs, même parmi les patients présentant un caryotype anormal, certaines des aberrations parmi les plus importantes dans le MM peuvent être silencieuses au caryotype. Ainsi, les translocations IgH sont difficiles à voir sur un caryotype du fait de la localisation télomérique du locus 14q32, et de ce fait sont sous-estimées par cette technique. Outre la recherche de trisomies et monosomies, la FISH peut être appliquée à la recherche de ces translocations, grâce à l'utilisation de sondes qui localisent les régions constantes et variables IgH. Finalement, la FISH est une technique sensible et spécifique qui permet l'identification des anomalies génétiques critiques du MM. La délétion du chromosome 13, et surtout la t(4;14) et la del17p sont ainsi recherchées par FISH au diagnostic chez les patients atteints de MM.

7.6 Cytométrie en flux

Actuellement, l'immunophénotypage par CMF est d'un intérêt scientifiquement reconnu pour le diagnostic et le suivi de nombreuses hémopathies, notamment les leucémies aiguës et les syndromes lymphoprolifératifs. En revanche, pour le MM, l'utilisation de la CMF est beaucoup moins courante, encore principalement restreinte aux études de recherche clinique. Néanmoins, des travaux récents ont montré d'une part la présence de marqueurs caractéristiques de la lignée plasmocytaire, permettant d'identifier ces cellules parmi les autres cellules hématopoïétiques analysées, et d'autre part l'expression de marqueurs aberrants (antigènes normalement non exprimés par les plasmocytes ou antigènes exprimés par les plasmocytes mais avec un niveau d'expression différent). Les marqueurs aberrants permettent de différencier phénotypiquement les cellules plasmocytaires malignes de celles physiologiques. Il est ainsi possible d'identifier, de caractériser et de quantifier les plasmocytes malins.

7.6.1 Caractéristiques phénotypiques du plasmocyte malin

Le plasmocyte malin est une cellule complexe avec une diversité morphologique, cytogénétique, mais aussi phénotypique [6]. Comme les plasmocytes normaux, les cellules myélomateuses sont positives pour les marqueurs caractéristiques de la lignée plasmocytaire, CD38 et CD138. Le protéoglycane CD138 (syndecan-1), typiquement exprimé par les plasmocytes, est un marqueur spécifique de la lignée plasmocytaire physiologique et aussi des plasmocytes malins [6].

Une forte expression de l'antigène CD38 a longtemps été considérée comme caractéristique des plasmocytes. Néanmoins, rappelons que cet antigène est également exprimé par certaines cellules B et T. En outre, les plasmocytes malins affichent un niveau d'expression de CD38 plus faible que celui des plasmocytes normaux [23, 32]. Les plasmocytes malins expriment à leur surface diverses molécules d'adhésion. La plupart d'entre elles sont également présentes sur les plasmocytes normaux, comme les intégrines CD11a/CD18 (LFA-1), CD49d/CD29 (VLA-4) et CD49e/CD29 (VLA-5), ou les protéoglycanes CD138 et CD44. L'expression de CD11a dans le MM serait corrélée avec la croissance tumorale. D'ailleurs, il semble que cette molécule soit impliquée dans des interactions entre les plasmocytes malins et le microenvironnement médullaire, ses ligands (CD54, ICAM-1 ; CD102, ICAM-2 ; CD50, ICAM-3) étant exprimés par les plasmocytes malins comme par les cellules stromales.

Cependant, les plasmocytes tumoraux expriment également certaines molécules d'adhésion que n'expriment pas ou faiblement les plasmocytes normaux. C'est le cas de deux molécules de la superfamille des Ig, le CD56 (NCAM) et le CD58 (LFA-3). Le CD56 (NCAM) est une molécule d'adhésion exprimée typiquement par les cellules NK, et rapportée pour la première

fois en 1990 comme étant fréquemment trouvée sur les plasmocytes malins [33]. Elle est en effet exprimée à la surface des plasmocytes dans 60 à 70% des cas de MM et sa surexpression caractérise la malignité [34].

A l'inverse des plasmocytes normaux, les plasmocytes malins ont une expression du marqueur pan-leucocytaire CD45 globalement très faible ou négative [14], [35]. Cependant, comme pour les cellules de la lignée plasmocytaire physiologique, l'expression de cet antigène est hétérogène [9], [35], [36]. En effet, CD45 est une tyrosine phosphatase nécessaire pour l'activation et le développement lymphocytaire. D'ailleurs il a été démontré que l'IL-6 stimulait préférentiellement les plasmocytes malins CD45 fort [35]. Retenons que CD45 représente un régulateur essentiel de la croissance et de la survie des plasmocytes malins. Une minorité de patients atteints de MM (moins de 15%) conservent l'expression de marqueurs associés à la lignée B comme CD19, CD20 ou CD22. La perte de CD19 est extrêmement fréquente, cet antigène étant exprimé dans moins de 5% des MM.

L'expression de CD20 est plus courante que celle de CD19, dans environ 20% des cas [6,9, 14], [28, 37, 38]. Notons que les plasmocytes malins CD20+ n'expriment ni le CD19, ni le CD22. En outre, la plupart des MM CD19+ ou CD20+ coexpriment le marqueur CD27 au diagnostic [14]. Le CD27 est une molécule essentielle dans la différenciation plasmocytaire, exprimée par les plasmocytes normaux et réactionnels. Dans le MM, la perte de cet antigène est fréquente et les plasmocytes malins ne présentent un phénotype CD27+ que dans 50 à 60% des cas [6,9, 39]. Les plasmocytes malins peuvent également exprimer certaines molécules impliquées dans la co-stimulation des lymphocytes B et T comme le CD40, dans environ deux tiers des cas de MM. Le CD28, marqueur lymphocytaire T, qui joue un rôle essentiel dans les interactions B-T, est retrouvé dans 15 à 45% des MM [40]. La glycoprotéine transmembranaire CD126, chaîne α du récepteur à l'IL-6 (liant l'IL-6), est exprimée par les plasmocytes tumoraux quel que soit le stade de la maladie, alors qu'elle est indétectable sur les plasmocytes normaux [41, 42]. Le CD221, récepteur de l'IGF-1 (IGF-1R) est retrouvé sur les plasmocytes malins dans environ trois quarts des cas de MM, alors qu'il n'est pas ou faiblement exprimé en situation physiologique ou réactionnelle [9, 11].

D'autres antigènes sont exprimés de façon aberrante par les plasmocytes malins tels que le CD33 et le CD117. La molécule CD33, marqueur de la lignée myélomonocytaire, est retrouvée à la surface des plasmocytes malins dans environ 20% des cas de MM [28, 32, 35, 37, 43]–[45]. L'antigène CD117 (c-kit), associé aux cellules souches (récepteur à activité tyrosine kinase pour des facteurs de croissance hématopoïétiques), est présent sur les plasmocytes malins chez

environ un tiers des patients [14, 28, 32, 37, 45], alors qu'il n'est jamais exprimé par les plasmocytes normaux [46].

7.6.2 Marqueurs de repérage

L'identification précise des plasmocytes malins par CMF est cruciale pour la détermination des caractéristiques phénotypiques particulières du MM. La double expression du CD38 et du CD138 permet d'affirmer la nature plasmocytaire d'une cellule médullaire, sans préjuger du caractère malin. Les plasmocytes malins sont traditionnellement identifiés par le profil CD38+++ / CD45 faible, ce qui ne permet pas d'identifier les MM composés par tout ou en partie de plasmocytes CD45+. Finalement, c'est la combinaison des trois marqueurs CD38/CD138/CD45 qui est reconnue comme étant la plus efficace pour l'identification des cellules plasmocytaires malignes [14, 47, 48]. En effet, cette triple identification permet d'éviter la contamination par des éléments CD38+ non plasmocytaires (ils seront CD138-) [14], de détecter les éléments CD38- ou faible (de rares cas de négativité du CD38 ont été rapportés dans le MM) [8]), de prendre en compte les éléments dont la densité antigénique de CD138 est faible, à savoir les cellules plasmocytaires apoptotiques ou très immatures, et enfin de distinguer les plasmocytes malins des plasmocytes physiologiques par l'expression de CD45.

8. DIAGNOSTIC

Le MM est le plus souvent découvert lors d'un bilan demandé suite à des douleurs osseuses chroniques, résistantes aux antalgiques, des fractures fréquentes ou spontanées, ou encore des symptômes liés à l'hypercalcémie.

Parfois le MM peut être asymptomatique à son début et une découverte fortuite peut se voir lors d'un bilan biologique sous forme d'un pic d'allure monoclonale à l'électrophorèse des protéines sériques, ou d'une hypogammaglobulinémie isolée ou associée à une vitesse de sédimentation augmentée en dehors de tout contexte infectieux ou inflammatoire.

Il n'est pas rare de découvrir le MM devant des manifestations liées à ses complications, telles que des signes d'insuffisance rénale ou des infections récidivantes.

Le diagnostic de MM repose sur une triade clinico-biologique comprenant, la plasmocytose médullaire, l'existence d'un composant monoclonal sérique et/ou urinaire et la présence de manifestations cliniques ou biologiques directement liées au MM. L'ensemble de ces éléments sont regroupés sous l'acronyme anglo-saxon de CRAB (hypercalcémie, insuffisance rénale, anémie ou lésions ostéolytiques attribuables à la prolifération plasmocytaire). L'IMWG a établi des critères diagnostiques standards résumés ci-dessous.

Critères révisés 2014		
GMSI	MMI	MMS
PMS < 3mg /dl Et PM < 10 Et Pas d'EDM	PMS ≥ 3mg/dl OU PM ≥ 10% et < 60% OU PMU ≥ 500mg/24h Et Pas d'EDM	PPC Et au moins 1 EDM CRAB PM ≥ 60% Ratio CLL ≥ 100 Au moins 1 lésion focale IRM

Tableau 1 : Nouveaux critères diagnostiques du myélome multiple. GMSI: Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), Protéine M (monoclonale) sérique (PMS) < 3mg/dl et plasmocytose médullaire (PM) < 10% et absence de critères CRAB, MMI: Myélome multiple indolent (SSM: smoldering multiple myeloma), Protéine M sérique ≥ 3mg/dl ou plasmocytose médullaire ≥ 10% et absence de critères CRAB, MMS: Myélome multiple symptomatique Prolifération plasmocytaire clonale (PPC) et critères de CRAB
CRAB: hypercalcémie, insuffisance rénale, anémie ou lésions ostéolytiques attribuables à la prolifération plasmocytaire, EDM: événement définissant le myélome ; PMU: protéine M urinaire ; CLL: chaînes légères libres

9. CLASSIFICATIONS ET FACTEURS PRONOSTICS

Le MM est une maladie dite hétérogène et certains patients vivent plus de dix ans alors que d'autres décèdent rapidement, en un ou deux ans. Différentes caractéristiques liées au patient, à la maladie et au traitement ont été identifiées pour aider à prédire l'évolution de la maladie.

9.1 La classification de Durie-Salmon (DS)

Cette classification a été développée dans les années 70 afin d'estimer la masse tumorale. Celle-ci était corrélée avec les critères cliniques, les caractéristiques biologiques et radiologiques, incluant le taux d'hémoglobine, la calcémie, la créatininémie, le taux de protéine monoclonale sérique et urinaire et le nombre de lésions osseuses [49].

Les patients étaient classés en stade I, II ou III, en fonction du degré d'atteinte des éléments précédemment cités. D'autre part, ils étaient sous classés en stade A ou B en fonction de la créatininémie, inférieure ou supérieure à 20 mg/L (tableau 2).

Stade	Critères	Masse tumorale (x 10 ¹² /m ²)
I	Tous les critères sont présents : -Hb > 10g/dl -calcémie normale -absence d'atteinte osseuse ou plasmocytome isolé -taux d'Ig monoclonale faible : IgG<50g/L, IgA<30g/L, composant monoclonal urinaire < 4g/24hrs	< 0,6 (faible)
II	Aucun des critères du stade III ni du stade I	0,6 à 1,2 (intermédiaire)
III	L'un au moins des critères suivants : -Hb<8,5g/Dl -calcémie>120mg/L -multiples lésions lytiques osseuses -taux élevé d'Ig monoclonale : IgG>70g/L, IgA>50g/L, Composant monoclonal urinaire > 12g/24hrs	>1,2 (élevée)
Sous classification : A : fonction rénale normale : créatinine < 20mg/L B : fonction rénale pathologique : créatinine ≥ 20mg/L		

Tableau 2 : Classification de Durie et Salmon

9.2 L'ISS: International Staging System (ISS)

Dans un souci d'améliorer l'objectivité de la classification pronostique précédente, un nouvel indice pronostique International a été établi, c'est le modèle pronostique ISS. Il intègre deux paramètres biologiques, l'albuminémie et le taux de la β 2 microglobuline (β 2m) [19, 46].

La β 2m est un test biologique facile et reproductible. Il a été rapidement décrit comme un important facteur pronostique depuis son introduction, il y a plus de 25 ans [50]. En effet, la β 2m est exprimée à la surface des plasmocytes malins et elle est relarguée dans le sérum par clivage protéolytique. Elle est ainsi, le reflet indirect de la masse tumorale.

L'ISS sépare les patients en 3 groupes à risque, avec des médianes de survie significativement différentes (tableau 3).

STADE	CRITERES	MEDIANE DE SURVIE
I	β 2 microglobuline < 3,5 mg/L ET Albuminémie ≥ 35g/dL	62 mois
II	Pas de critères de stade I ou III	44 mois
III	β 2 microglobuline ≥ 5,5 mg/L	29 mois

Tableau 3 : Classification ISS

9.3 ISS-Révisé

La classification ISS a de nombreux avantages dont celui d'être plus reproductible que la classification de DS et est plus facilement utilisable dans les essais cliniques.

Elle a cependant quelques inconvénients. Le groupe III est un groupe hétérogène de patients avec une β_2m augmentée, pouvant être secondaire aussi bien à la masse tumorale, qu'à une insuffisance rénale. En effet, la β_2m étant d'élimination essentiellement rénale, à masse tumorale égale, son taux sérique sera plus élevé chez un patient insuffisant rénal. Par ailleurs, ce score n'intègre pas l'impact pronostique des anomalies cytogénétiques dont le rôle est reconnu aujourd'hui comme majeur.

L'Intergroupe Francophone du Myélome (IFM), après étude de 1064 patients traités de façon homogène dans les essais IFM99, avait défini 3 groupes de patients en fonction de la β_2m et de la présence ou non d'une t(4 ; 14) ou une del(17p) (18). Le premier groupe de patients dit à haut risque comporte une $\beta_2m > 4$ mg/L et la présence d'une t(4 ; 14) ou d'une del(17p) avec une survie médiane ne dépassant pas 20 mois (10%). Le deuxième groupe de patients dit de faible risque, présente une $\beta_2m < 4$ mg/L et l'absence de t(4 ; 14) ou de del(17p) avec une survie médiane à 5 ans d'environ 80% (50%) et enfin le troisième groupe de patients dit à risque intermédiaire, ne comporte, ni les signes du 1^{er} groupe ni ceux du second groupe et représente 40% [51].

Il est indispensable aujourd'hui, de pratiquer systématiquement une analyse cytogénétique par FISH à la recherche de la del(13), del(17p), la t(4 ; 14), et la t(14,16) couplée aux autres marqueurs tels que la β_2m et la stadification ISS. Cette analyse permettra de stratifier le risque, d'anticiper la réponse aux traitements et peut-être, à l'avenir, de choisir la meilleure stratégie thérapeutique. Cette stratification du risque doit être réalisée dès le diagnostic (tableau 4) [52].

RISS	
RISS STADE	CRITERES
STADE I	STADE I ISS Risque standard CA par FISH LDH NORMAL
STADE II	ni R ISS I ni R ISS II
STADE III	ISS III et soit Haut risque CA par FISH Ou LDH élevé

Tableau 4: Classification ISS Révisé

10. FORMES CLINIQUES

Les critères diagnostiques permettent de distinguer le MM des formes apparentées.

10.1 Le MM asymptomatique dit indolent (SMM, smoldering myeloma)

Le MM indolent est défini par la plasmocytose médullaire supérieure à 10% et/ou la protéine M supérieure à 30 g/L et l'absence d'atteinte organique attribuable au processus de prolifération plasmocytaire (aucun des critères CRAB). Cet état peut rester stable pendant plusieurs années, mais l'évolution vers un MM symptomatique est inéluctable. Le taux de transformation est d'environ 10% chaque année et justifie une surveillance étroite.

10.2 Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS)

Elle associe une protéine M (monoclonale) sérique (PMS) < 3mg/dl et une plasmocytose médullaire (PM) < 10% et l'absence de critères du CRAB.

10.3 Le MM non excréteur ou non sécrétant

Il s'agit des rares cas de MM sans Ig monoclonale sérique ou urinaire avec une plasmocytose médullaire dépassant 20% ou des lésions osseuses caractéristiques.

10.4 Le plasmocytome

Il correspond à une localisation isolée stable de plasmocytes monoclonaux anormaux. La localisation de cette tumeur plasmocytaire solide, peut être osseuse, ganglionnaire ou viscérale. Son caractère excréteur n'est pas constant et contrairement au MM, le myélogramme ne met généralement pas en évidence d'infiltration médullaire par les plasmocytes tumoraux. Le diagnostic est histologique. Le risque d'évolution en MM est relativement important, 15 à 55% des cas [53].

10.5 Le syndrome de POEMS

Les lésions osseuses du plasmocytome peuvent être associées de façon plus ou moins complète à une polyneuropathie, une organomégalie (foie, rate, ganglions), une endocrinopathie, la présence d'une Ig monoclonale et des modifications cutanées (Skin) formant le syndrome désigné par l'acronyme POEMS.

11. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

Il est essentiellement posé en cas de plasmocytose réactionnelle. Elle accompagne certains syndromes mononucléosiques et peut s'observer notamment dans des cas de rubéole ou d'hépatite virale. Elle peut être associée à des réactions allergiques, des viroses diverses, des maladies immunitaires (rhumatismes inflammatoires), des cirrhoses, aussi bien qu'à des hémopathies malignes, comme certains lymphomes T avec activation B, ou d'autres cancers avec métastases ostéo-médullaires.

12. TRAITEMENT

Pendant des décennies les médicaments actifs contre le MM se résumaient aux agents alkylants (melphalan) et à la corticothérapie à fortes doses. Jusqu'à la fin des années 1990, il n'y a eu aucun progrès significatif avant l'avènement de l'intensification thérapeutique suivie d'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Plus récemment l'arrivée de nouvelles molécules a considérablement modifié le paysage du traitement du MM (figure 2).

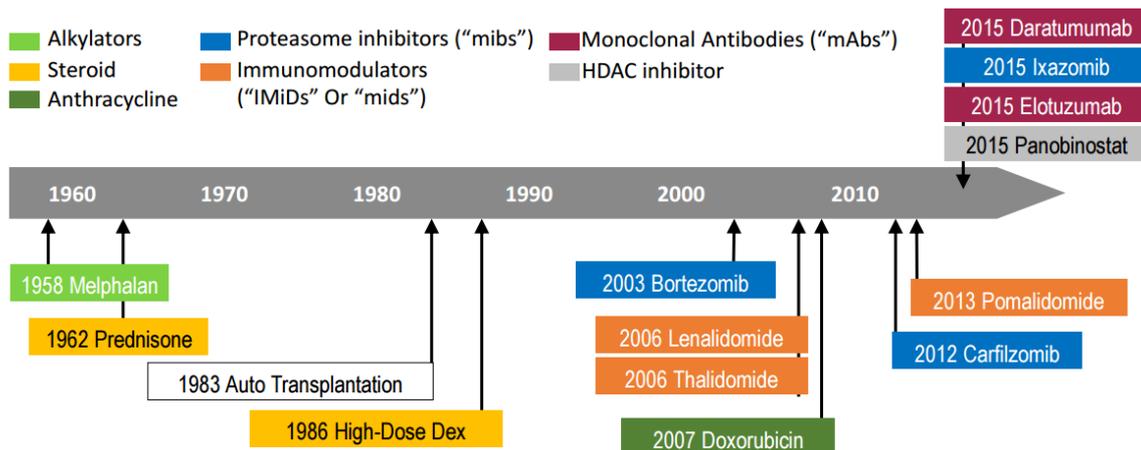


Figure 3 : Calendrier représentant l'histoire et le traitement du myélome multiple de 1958 à aujourd'hui.

12.1 Traitement anti tumoral

12.1.1 Les moyens thérapeutiques utilisés

Il est admis qu'il n'y a pas d'indication à instituer une chimiothérapie anti-tumorale chez les patients asymptomatiques à faible masse tumorale, ce sont les MM indolents de stade I de la classification de Durie et Salmon, et qui peuvent rester stables plusieurs années. En pratique donc, seuls les patients présentant un myélome évolutif avec présence de lésions osseuses lytiques, une insuffisance rénale, une anémie, ou une hypercalcémie, bénéficient d'un traitement anti-tumoral. Notons bien que le stade ISS ne change rien à la décision thérapeutique.

12.1.1.1 Les molécules de chimiothérapie

Le traitement de référence du MM tout âge confondu est resté pendant de nombreuses années, basé sur l'association d'un alkylant (Melphalan, Alkeran® ou Cyclophosphamide, Endoxan®) à des glucocorticoïdes (Prednisone, Dexaméthasone), appelée Alexanian. Cette association a permis l'obtention d'une survie globale médiane de l'ordre de 3 ans [28]. D'autres molécules de chimiothérapie ont été utilisées, comme la doxorubicine, la vincristine, le Cisplatine, l'Etoposide, ou la Carmustine [54–56].

12.1.1.2 Nouvelles molécules

Depuis une dizaine d'années, le paysage thérapeutique du MM s'est enrichi de nouveaux principes actifs, appartenant à différentes classes médicamenteuses et ayant de nouveaux mécanismes d'action, ce qui a contribué à améliorer de façon significative la survie et l'évolution du MM. Nous citerons ceux qui sont les plus couramment utilisés à l'heure actuelle.

12.1.1.2.1 Les immunomodulateurs (IMiDs)

La Thalidomide fait partie de la classe des immunomodulateurs. Elle possède principalement une activité anti-angiogénique mais agit également selon d'autres mécanismes. Ses effets toxiques principaux sont la neuropathie périphérique par toxicité cumulative et les thromboses veineuses [57].

Le Lénalidomide (Revlimid®) est un analogue structural de la thalidomide avec un profil de toxicité différent. Sa toxicité principale est hématologique et il n'est pas responsable d'effets secondaires neurologiques [58].

Le Pomalidomide est la 3ème molécule de la famille des IMiDs, utilisée dans le traitement du myélome. Ce médicament est plus puissant que les deux premiers, et s'accompagne de moins d'effets indésirables, en particuliers neurologiques, comme les neuropathies. Les principaux effets indésirables sont les thromboses veineuses profondes et les neutropénies induisant un risque d'infection [59].

12.1.1.2.2 Les inhibiteurs du protéasome

Le Bortézomib (Velcade®) est le premier inhibiteur du protéasome. Il diminue la prolifération ainsi que la survie des plasmocytes malins en bloquant leur progression dans le cycle cellulaire et en restaurant l'apoptose. L'activité anti-myélome est aussi médiée par l'inhibition de la production d'IL-6 par les cellules stromales médullaires. Ses effets toxiques majeurs sont l'asthénie et la neuropathie périphérique (tableau5) [60].

Le Carfilzomib est un inhibiteur du protéasome de deuxième génération. Il diffère de son prédécesseur par son action sélective sur l'activité chymotrypsin-like du protéasome, expliquant probablement la moindre survenue de neuropathies. Le carfilzomib est peu neurotoxique [61].

L'Ixazomib est un inhibiteur du protéasome de troisième génération. Il fait partie de la famille des acides boroniques, et il est le premier inhibiteur du protéasome utilisé par voie orale. Sa bonne tolérance, en particulier sa faible incidence de neuropathies périphériques a conduit à l'associer au lénalidomide et à la dexaméthasone. A noter toutefois la survenue de rash cutané peu étendus [62].

12.1.1.2.3 Les anticorps monoclonaux (Acm)

Le Daratumumab est le premier anticorps anti-CD38 utilisé au cours du MM. En 2012 le daratumumab, Acm anti-CD38 a été utilisé en monothérapie dans le MM en rechute et/ou réfractaire, en escalade de dose dans le cadre d'un essai thérapeutique de phase I. Les résultats obtenus rapportent un taux de réponse de 40 %. Deux ans plus tard, l'association Lenalidomide-Dexaméthasone+ Daratumumab dans le MM en rechute et/ou réfractaire a montré de très bons résultats avec des taux de réponse globale proches de 100%. La tolérance générale était excellente, la toxicité étant essentiellement représentée par des réactions liées à la perfusion [63].

L'Elotuzumab est le deuxième anticorps monoclonal anti-CD38 utilisé dans le MM. Son efficacité est moindre en monothérapie, mais elle s'est avérée augmentée en association avec le lénalidomide [64].

12.1.1.2.4 Les inhibiteurs de l'histone déacétylase

Le Panobinostat est une molécule appartenant à la famille des inhibiteurs de l'histone déacétylase dont les effets concourent à maintenir dans un état actif les gènes qui bloquent la division et la croissance des plasmocytes malins. Il est indiqué en association avec le bortézomib et la dexaméthasone, dans le traitement des patients adultes atteints de myélome multiple en rechute et/ou réfractaire. Sa toxicité digestive à type de diarrhées n'est pas négligeable [65].

<i>DÉNOMINATION DU MÉDICAMENT</i>	<i>AUTRE DÉNOMINATION</i>	<i>COMMENTAIRES</i>
Agents traditionnels		
melphalan* (M)**	Alkeran® (par voie orale ou IV)	Meilleur agent unique pour le traitement
cyclophosphamide* (C ou CY)**	Cytosan® (par voie orale ou IV) Bis-chloro-Nitrosourea®	Efficacité similaire au M, mais avec une toxicité GI et GU accrue et des lésions moindres des cellules souches médullaires
prednisone (P)**	Prednisolone® (similaire) (habituellement par voie orale)	Activité instantanée, fonctionne bien avec le M, le C et le B. Non-myélosuppresseur
dexaméthasone (D)**	Decadron® (par voie orale ou IV)	Similaire à la prednisone mais plus puissante ; effets indésirables plus graves
Nouveaux agents		
Doxorubicine pégylée liposomale*	Doxil® (par voie IV)	En association, activité prometteuse, moins toxique que le A
bortézomib (B, V, ou P)**	VELCADE® (par voie IV)	Activité instantanée, utilisé seul ou en association
thalidomide (T)**	Thalomid® (par voie orale)	Activité instantanée, autorisé pour l'utilisation en association, entre autres, avec la dexaméthasone
lénalidomide (R or L)**	Revlimid® (par voie orale)	Activité instantanée, autorisé pour l'utilisation en association, entre autres, avec la dexaméthasone
carfilzomib	Kyprolis® (par voie IV)	Activité instantanée, utilisé seul ou en association
pomalidomide	Pomalyst®/Imnovid® (par voie orale)	Activité instantanée, utilisé seul ou en association
panobinostat	Farydak® (par voie orale)	Autorisé pour l'utilisation en association avec le bortézomib et la dexaméthasone
daratumumab	Darzalex®	Approuvé pour utilisation en monothérapie chez des patients ayant déjà reçu au moins 3 lignes de traitement
élotuzumab	Empliciti®	Approuvé pour utilisation en association avec len/dex chez des patients ayant déjà reçu 1 à 3 lignes de traitement antérieur
ixazomib	Ninlaro®	Approuvé pour utilisation en association avec len/dex chez des patients ayant déjà reçu 1 traitement antérieur

Tableau 5 : Principales drogues utilisées

12.1.1.3 Intensification et autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Jusqu'à la fin des années 1990, il n'y a eu aucun progrès significatif dans le traitement du MM. L'avènement de l'intensification suivie de l'autogreffe de CSH a permis à la fois une augmentation des taux de réponse globale et une amélioration nette de la survie globale [14]. Le principe de l'intensification est basé sur la réduction de la masse tumorale par une chimiothérapie d'induction suivie d'une intensification thérapeutique, elle-même basée sur l'utilisation de fortes doses de chimiothérapie. Au cours du MM, le melphalan injectable à haute dose (200 mg/m² en IV) est le plus communément utilisé, suivi de la perfusion de CSH autologues prélevées au préalable. Cette modalité thérapeutique a permis d'améliorer significativement le taux de rémission complète et la médiane de survie qui est actuellement supérieure à 50 mois [66].

Cependant, l'analyse des courbes de survie montre qu'il n'apparaît pas de plateau pouvant suggérer la guérison des patients [66].

12.1.1.4 L'allogreffe de CSH

Elle a été proposée comme traitement du MM en rechute ou réfractaire ou présentant une del17p [67], [68].

Cette approche est intéressante, car il existe, comme dans les leucémies aiguës, un effet GVL (graft versus leukemia), un effet greffon contre myélome. Mais cette procédure nécessite l'obtention d'une rémission complète et est grevée d'une morbidité et d'une mortalité importante. La diminution de l'intensité du conditionnement par des mini-allogreffes pourrait diminuer la morbidité et participer à l'allongement de la survie des patients [12,15]. Cette indication dans le MM demeure cependant très controversée et la majorité des études ont montré des résultats peu significatifs par rapport aux nouvelles molécules [69].

12.1.2 Stratégies thérapeutiques

12.1.2.1 Patient éligible à une intensification suivie d'une autogreffe de CSH

Les objectifs du traitement sont l'obtention d'une réduction profonde de la masse tumorale associée à une toxicité moindre de la procédure.

Elle est indiquée, chez les patients jeunes, âgés en principe moins de 65 ans et sans comorbidités(s) grave(s) la contre-indiquant.

Le schéma thérapeutique de référence comprend les séquences suivantes, une réduction de la masse tumorale par une chimiothérapie d'induction comportant les nouvelles molécules (thalidomide, bortézomib et lénalidomide, etc.), une intensification avec du melphalan à forte dose et l'autogreffe de CSH.

Actuellement, l'intensification suivie d'autogreffe de CSH, est suivie d'un traitement dit de consolidation et éventuellement un traitement d'entretien (thalidomide ou lénalidomide). Cette stratégie de prise en charge du MM a permis d'allonger la survie médiane à 7 ou 8 ans, avec un taux de rémission complète compris entre 30 et 50%. [46, 70, 71].

12.1.2.2 Patients non éligibles à l'intensification

La limite d'âge au-delà de laquelle les patients ne relèvent plus du traitement intensif mais du traitement standard varie selon les équipes. Elle est souvent fixée à 65 ans, mais certains estiment que l'autogreffe doit être discutée chez des patients jusqu'à 75 ans [72] d'où la notion de malades fit et unfit. Par ailleurs des patients jeunes peuvent être inéligibles à une intensification en raison de comorbidité grave contre indiquant une autogreffe de CSH. L'objectif du traitement est de prolonger la survie et de préserver une bonne qualité de vie. Initialement, chez les sujets âgés, le traitement standard a été longtemps de type MP (melphalan et prednisone) et a permis d'obtenir une médiane de survie d'environ 30 mois [28]. Le pronostic de ces patients a été transformé depuis, par l'apparition des nouvelles molécules. Ainsi, les associations médicamenteuses de référence, actuellement recommandées sont de type Bortézomib-Melphalan-Prednisone ou Lenalidomide-Dexaméthasone [73].

12.2 Traitement de support

12.2.1 Les antalgiques

Un traitement antalgique doit être prescrit en cas de douleurs osseuses. Il sera utilisé par palier, selon l'échelle antalgique de l'OMS ci-dessous [74].

Palier 1	Paracétamol, AINS, aspirine
Palier 2 (opioïdes faibles)	Codeine, Dihydrocodeine, Tramadol
Palier 3 (opioïdes forts)	Morphine, chlorhydrate de morphine

Tableau 6 : Échelle des antalgiques selon OMS.

12.2. 2 Les biphosphonates

Les biphosphonates sont des molécules qui se fixent à la surface des os endommagés des patients atteints de myélome. Cette fixation inhibe la destruction osseuse et peut augmenter les chances que l'os cicatrise et retrouve sa densité et sa force.

Les recommandations 2013 de l'IMWG pour le traitement des maladies osseuses liées au myélome stipulent que le traitement par les biphosphonates doit être envisagé chez tous les patients bénéficiant d'un traitement de première intention dans le myélome, indépendamment de la présence ou non de lésions ostéolytiques à la radiographie classique.

Les mêmes recommandations stipulent que, pour les patients présentant une RC ou une TBRP, la durée optimale du traitement par les biphosphonates n'est pas clairement définie. Ceux-ci

doivent être administrés pendant une période minimale de 12 mois et pouvant aller jusqu'à 24 mois. La durée du traitement restant à l'appréciation du médecin.

Pour les patients qui présentent une maladie active, et qui n'ont pas répondu au traitement par chimiothérapie ou qui présentent une maladie osseuse depuis plus de deux ans, une diminution du traitement peut être envisagée pour une durée de trois mois.

12.2.3 Les antibiotiques

Chez les patients atteints de myélome, les infections représentent un problème fréquent et récurrent. Une stratégie prudente de gestion des infections s'avère nécessaire. Un traitement par antibiotiques doit être instauré immédiatement en cas de suspicion d'une infection active. Mais l'utilisation d'antibiotiques en traitement préventif ou prophylactique d'une infection récurrente reste controversée [75].

L'administration de fortes doses de gammaglobulines peut être nécessaire chez les patients souffrant d'infections récurrentes aiguës et graves. Il peut être utile d'utiliser le G-CSF pour augmenter la numération leucocytaire afin d'éliminer les complications liées à l'infection. L'utilisation du G-CSF s'avère utile pendant la phase d'aplasie post autogreffe de cellules souches.

12.2.4 Les antiviraux

Une augmentation de l'incidence du zona a été observée chez certains groupes de patients atteints de myélome et traités par Bortézomib [76]. Par conséquent, il est préférable d'envisager un traitement antiviral prophylactique en complément du traitement par Bortézomib. Ainsi, on recommande également l'administration d'antiviraux à des fins prophylactiques aux patients recevant du carfilzomib, un inhibiteur du protéasome de deuxième génération. Les patients atteints de myélome sont avertis qu'ils ne doivent pas recevoir le vaccin contre le zona (Zostavax®), car il contient un virus vivant représentant un risque important pour les personnes dont le système immunitaire est affaibli.

12.2.5 Les agents stimulants l'érythropoïèse

Ils doivent être instaurés chez les patients recevant de la chimiothérapie avec un taux d'Hb < 10g/dl. L'efficacité d'un traitement par érythropoïétine (EPO) est estimée à 50-60 % [77]. La réponse est caractérisée par une élévation du taux d'hémoglobine, une diminution des besoins transfusionnels et une amélioration de la qualité de vie.

Les principales molécules utilisées sont l'érythropoïétine alpha (Eprex®) administrée à la dose de 40.000UI une fois/semaine en S/C, et la Darbépoïétine alpha (Aranesp®) administrée à la dose de 300 µg toute les 03 semaines en S/C.

12.2.6 Les transfusions sanguines

L'indication d'une transfusion prend en compte le taux d'hémoglobine et l'état clinique du patient. Le seuil d'indication de la transfusion est de 8 g/dl avec des signes d'intolérance.

12.2.7 La radiothérapie à visé antalgique

La radiothérapie est une indication devant une localisation douloureuse rebelle aux antalgiques. La prescription sera faite à doses fractionnées, 15 Gy sur 2 semaines ou une dose de 8 Gy en une seule fraction.

12.3 Traitement du myélome en rechute

Le myélome étant une maladie incurable à l'heure actuelle, la majorité des patients vont rechuter. Le pronostic des patients en rechute reste mauvais malgré les nouveaux traitements disponibles. Pour les patients ayant subi une autogreffe de CSH, si la rechute survient dans un délai de 2 ans, il sera possible d'envisager une seconde autogreffe. Si la rechute intervient en moins de 6 mois après la fin de la première ligne de traitement, il est possible de réadministrer les mêmes molécules. L'un des traitements standard est l'association Lénalidomide-Dexaméthasone à faible dose (Rd). Il est aussi possible d'utiliser le Bortézomib associé à la dexaméthasone (VD) ou au Lénalidomide (VR) [78].

13. CRITÈRES DE RÉPONSE

Pour pouvoir comparer l'efficacité des nouvelles stratégies thérapeutiques dans les essais cliniques, il est indispensable de disposer de critères de réponse validés et reproductibles. C'est aussi un besoin en clinique de routine pour évaluer la réponse au traitement directement au niveau individuel du patient. En outre, étant donné l'efficacité des nouveaux agents disponibles, il devient nécessaire d'évaluer la magnitude de la réponse obtenue. Enfin, il est important de pouvoir détecter la rechute le plus précocement possible.

13.1 Méthodes d'évaluation de la réponse

Il existe différentes méthodes d'évaluation de la réponse .

13.1.1 Le médullogramme :

Il s'agit d'une mesure directe mais relativement peu sensible. Le seuil limite retenu du taux de plasmocytes médullaires est de 5%.

13.1.2 L'évaluation du composant monoclonal sérique ou urinaire

Elle présente des limites importantes. Elle renseigne sur la variation du taux du composant monoclonal plutôt que sur l'évaluation directe de la masse tumorale.

13.1.3 Ratio FLC

Il est défini par le rapport des chaînes libres kappa sur les chaînes libres Lambda. Ce test mesure en temps réel le changement de la masse tumorale [79].

13.1.4 Evaluation de la réponse par biologie moléculaire utilisant une polymérase chaîne réaction allele-spécifique (ASO-PCR).

Elle fournit une meilleure évaluation par rapport à l'immunofixation [80].

13.1.5 Cytométrie en flux

Il s'agit d'une technique sensible et directement quantitative. Elle a été simplifiée grâce à l'acquisition sur un tube unique et l'utilisation de 6 à 8 couleurs. Il persiste cependant, le problème du gating, des méthodes de préparation et de caractérisation immunophénotypique d'où la nécessité d'avoir recours aux documents de consensus de l'EMN, du GEIL, ou de l'EUROFLOW.

13.2 Problèmes liés à la surveillance de la maladie

Les premiers critères d'évaluation du traitement au cours du MM étaient essentiellement basés sur les examens de routine comme le médullogramme, l'électrophorèse des protéines et le ratio FLC (Tableau 7).

Réponse complète - <i>Complete response (CR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Immunofixation du sérum et des urines négative ▶ et disparition de tout plasmocytome des tissus mous ▶ et moins de 5 % d'infiltration plasmocytaire au myélogramme
Réponse complète stricte - <i>Stringent complete response (sCR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Réponse complète comme décrite ci-dessus ▶ associée à un ratio de chaînes légères libres (<i>ratio FLC – free light chain</i>) normal ▶ et à l'absence de cellule clonale au myélogramme par immunohistochimie ou par immunofluorescence
Très bonne réponse partielle (TBRP) - <i>Very good partial response (VGPR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Immunoglobuline monoclonale détectable dans le sang et les urines en immunofixation mais non détectable par électrophorèse ▶ ou réduction de ≥ 90 % de l'immunoglobuline monoclonale sérique et l'immunoglobuline monoclonale dans les urines < 100 mg par 24 h
Réponse partielle (RP) - <i>Partial response (PR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Réduction ≥ 50 % de l'immunoglobuline monoclonale sérique ▶ et réduction ≥ 90 % de l'immunoglobuline monoclonale dans les urines ou < 200 mg par 24 h ▶ Si l'immunoglobuline monoclonale n'est pas mesurable, une réduction ≥ 50 % de la différence entre le niveau des chaînes légères impliquées et non impliquées est nécessaire à la place du critère sur l'immunoglobuline monoclonale. ▶ Si l'immunoglobuline monoclonale et le niveau des chaînes légères ne sont pas mesurables, une réduction ≥ 50 % de l'infiltration plasmocytaire au myélogramme est nécessaire sous réserve que le pourcentage de base était ≥ 30 %. ▶ En plus des critères ci-dessus, une réduction de la taille des plasmocytomes des tissus mous de ≥ 50 % est nécessaire, si présents avant traitement.

Tableau 7 Critères de la réponse IMWG 2009

Pour répondre aux nouvelles attentes, l'IMWG a redéfini les critères d'évaluation de la réponse dans le MM (Tableau 8).

Réponse complète - <i>Complete response (CR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Immunofixation du sérum et des urines négative ▶ et disparition de tout plasmocytome des tissus mous ▶ et moins de 5 % d'infiltration plasmocytaire au myélogramme
Réponse complète stricte - <i>Stringent complete response (sCR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Réponse complète comme décrite ci-dessus ▶ associée à un ratio de chaînes légères libres (<i>ratio FLC – free light chain</i>) normal ▶ et à l'absence de cellule clonale au myélogramme par immunohistochimie ou par immunofluorescence
Très bonne réponse partielle (TBRP) - <i>Very good partial response (VGPR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Immunoglobuline monoclonale détectable dans le sang et les urines en immunofixation mais non détectable par électrophorèse ▶ ou réduction de ≥ 90 % de l'immunoglobuline monoclonale sérique et l'immunoglobuline monoclonale dans les urines < 100 mg par 24 h
Réponse partielle (RP) - <i>Partial response (PR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Réduction ≥ 50 % de l'immunoglobuline monoclonale sérique ▶ et réduction ≥ 90 % de l'immunoglobuline monoclonale dans les urines ou < 200 mg par 24 h ▶ Si l'immunoglobuline monoclonale n'est pas mesurable, une réduction ≥ 50 % de la différence entre le niveau des chaînes légères impliquées et non impliquées est nécessaire à la place du critère sur l'immunoglobuline monoclonale. ▶ Si l'immunoglobuline monoclonale et le niveau des chaînes légères ne sont pas mesurables, une réduction ≥ 50 % de l'infiltration plasmocytaire au myélogramme est nécessaire sous réserve que le pourcentage de base était ≥ 30 %. ▶ En plus des critères ci-dessus, une réduction de la taille des plasmocytomes des tissus mous de ≥ 50 % est nécessaire, si présents avant traitement.
Maladie stable - <i>Stable disease (SD)</i>	Ne répond pas aux critères des CR, sCR, VGPR, PR ou PD
Maladie en progression - <i>Progressive disease (PD)</i>	<p>Augmentation de 25 % par rapport à la valeur de réponse la plus basse pour au moins un des points suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ immunoglobuline monoclonale sérique (l'augmentation absolue doit être $\geq 0,5$ g/100 mL) ▶ immunoglobuline monoclonale dans les urines (l'augmentation absolue doit être ≥ 200 mg par 24 h) ▶ pour les patients dont l'immunoglobuline monoclonale n'est pas mesurable dans le sang ou les urines : la différence entre le niveaux des chaînes légères impliquées et non impliquées (l'augmentation absolue doit être > 100 mg/L) ▶ pourcentage d'infiltration plasmocytaire (le % absolu doit être ≥ 10 %) <p>Développement de nouvelles lésions osseuses ou de plasmocytomes des tissus mous ou augmentation de la taille d'une lésion osseuse ou des tissus mous préexistants</p> <p>Développement d'une hypercalcémie (calcémie corrigée $> 11,5$ mg/100 mL) ne pouvant être attribué à une autre cause</p>

Tableau 8: Nouveaux Critères d'évaluation de la réponse IMWG 2011

L'efficacité des schémas thérapeutiques actuels incluant les nouveaux médicaments est définitivement démontrée et s'accompagne pour les patients, non seulement d'un gain en survie sans progression de la maladie mais également d'une amélioration de la survie globale. En outre, l'amélioration de la connaissance de la biologie du MM laisse espérer l'apparition de nouvelles armes thérapeutiques. La définition d'une catégorie de réponse complète stricte et le début de l'évaluation de la maladie résiduelle témoignent de l'objectif de voir prochainement le MM se transformer en une maladie chronique, avant l'arrivée d'un nombre significatif de rémissions très prolongées. De ce fait, des critères initiaux de mauvais pronostic mais aussi une MRD positive en fin d'induction et en pré-autogreffe pourraient poser l'indication d'une réinduction, d'une double autogreffe ou encore d'un traitement d'entretien.

13.3 Concept de la maladie résiduelle

La maladie résiduelle (MRD) est définie par la persistance, dans le tissu examiné, de cellules malignes en dessous du seuil de détection par les techniques conventionnelles, au terme d'une séquence thérapeutique à visée éradicatrice. Elle permet une évaluation réelle de l'efficacité et de la réponse au traitement, de prévoir précocement le risque de rechute et voir même d'adapter le traitement. Pour cela, elle nécessite des conditions spécifiques et rigoureuses relatives à la technique utilisée.

13.3.1 Critères d'évaluation de la maladie résiduelle

L'évaluation de la MRD nécessite certaines conditions relatives aux marqueurs utilisés et à la technique adoptée. Le marqueur tumoral utilisé doit être fréquent, spécifique de la tumeur plutôt que spécifique du patient, stable dans le temps et à la rechute, dans le but d'éviter les faux-négatifs au cours du suivi des patients. Les techniques doivent avoir une sensibilité d'au moins 10^{-4} , une spécificité, afin d'éviter les faux-positifs, une reproductibilité inter-laboratoire, une standardisation rigoureuse, un contrôle de qualité et enfin une rapidité de rendu des résultats de MRD.

13.3.2 Choix du marqueur et de la technique

Ils varient selon la pathologie étudiée et selon le type d'anomalie recherchée ; Il est génétique ou phénotypique ou par imagerie. Les anomalies génétiques recherchées sont les mutations de gènes, les aberrations chromosomiques, essentiellement les translocations avec ou sans expression d'un transcrite de fusion. Les anomalies phénotypiques sont exprimées par des phénotypes aberrants spécifiques à la tumeur. Les techniques d'évaluation possibles sont la biologie moléculaire (PCR quantitative en temps réel) et la cytométrie en flux multiparamétrique.

Parmi les techniques biologiques disponibles, la cytométrie de flux est la plus anciennement utilisée. Son avantage repose sur sa grande accessibilité et son coût acceptable, mais sa sensibilité dépend du nombre de cellules analysées et du nombre de marqueurs étudiés. Cette technique permet d'atteindre une sensibilité de l'ordre de 10^{-5} contre seulement 10^{-4} lorsque le nombre de cellules évaluées est inférieur à ce seuil. L'utilisation des recommandations de cytométrie de haute sensibilité permet d'identifier une population présentant une PFS et une OS prolongées en comparaison aux réponses moins profondes [81].

La deuxième technique disponible est le séquençage de nouvelle génération (Next Génération Sequencing, NGS) dont le principal intérêt est sa grande sensibilité chez la majorité des patients avec un seuil de 10^{-6} et sa bonne corrélation avec la cytométrie de flux. Son principal inconvénient est sa moins grande disponibilité, son coût important et l'absence de marqueur informatif chez environ 5% des patients. De façon identique à la cytométrie, une RC MRD- en technique NGS est associée à une PFS plus longue qu'une MRD+ dans l'analyse de l'étude de 1^{ère} ligne de l'IFM 2009.

L'imagerie est un élément crucial pour le diagnostic. Désormais, l'imagerie ne se cantonne plus à ce rôle et l'avènement de nouvelles techniques comme la TEP-TDM et les dernières évolutions de l'IRM procurent un rôle prépondérant à l'imagerie, à la fois sur le plan pronostique ainsi que sur l'évaluation de la réponse. Cependant, plusieurs problèmes restent à résoudre, dont le principal demeure le manque de standardisation pour l'évaluation de la réponse par la TEP [82].

À l'heure actuelle, il n'existe pas de recommandations claires, de suivi de la MRD, en dehors de protocoles d'essai clinique, mais l'International Myeloma Working Group (IMWG) a récemment actualisé ses critères de réponse selon les critères de négativité de la MRD, et l'obtention d'une TEP négative. L'obtention d'une MRD négative va clairement s'imposer comme un critère de RC dans les futurs essais cliniques, aussi bien en 1^{ère} ligne qu'en rechute (Tableau 9).

Sous-catégories de réponse		Critères de réponse
Critères IMWG de MRD négative (si les patients sont en RC selon les critères habituels)	MRD négative maintenue	MRD négative dans la MO (NGS ou NGF) et par imagerie comme défini préalablement confirmé à 1 an. Des évaluations supplémentaires peuvent être proposées (MRD nég à 5 ans)
	MRD négative en imagerie	MRD négative comme définie préalablement (NGS ou NGF) PLUS Disparition de toute trace de fixation du marqueur sur des cibles au diagnostic ou sur une autre TEP
	MRD négative en cytométrie de flux	Absence de cellules clonales plasmocytaires avec un phénotype anormal par NGF sur des prélèvements de MO selon les procédures définies par l'EuroFlow (ou méthode équivalente) avec une sensibilité minimale de 10^{-5} ou mieux
	MRD négative par séquençage	Absence de cellules clonales plasmocytaires par NGS sur des prélèvements de MO dans lequel la présence d'un clone est défini par au moins 2 séquences identiques obtenues après le séquençage de l'ADN en utilisant la plateforme Lymphosight® avec une sensibilité minimale de 10^{-5} ou mieux

Kumar SK et al. Lancet Oncology 2016

Tableau 9: Critères IMWG de MRD dans le myélome multiple

14. LA CYTOMÉTRIE EN FLUX

14.1 Définition

La cytométrie en flux ou CMF est une technologie qui permet l'analyse simultanée qualitative et quantitative de multiples paramètres à l'échelon cellulaire dans une population hétérogène en suspension dans un liquide. La cytométrie en flux est utilisée dans un grand nombre d'applications comme l'immunophénotypage, l'analyse du cycle cellulaire, le comptage des cellules. Les données sur la cellule, recueillies par le cytomètre en flux, sont la taille relative de la cellule, sa granularité et enfin son intensité relative de fluorescence [25, 26]. Ce procédé d'analyse individuelle, cellule par cellule, est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représentent sous la forme d'histogrammes (1 paramètre) ou de cytogrammes (2 paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

14.2 Principes

14.2.1 Composition d'un cytomètre

Le cytomètre en flux est un appareil de mesure complexe qui possède trois systèmes, un système fluide, qui entraîne et présente l'échantillon cellulaire au point d'interrogation, un système optique, comprenant les lasers comme source de lumière avec des filtres optiques qui séparent la lumière émise par la cellule et la dirigent vers les détecteurs, et enfin le système électronique, qui va convertir la lumière en signaux électroniques, analysables par l'ordinateur (Figure4).

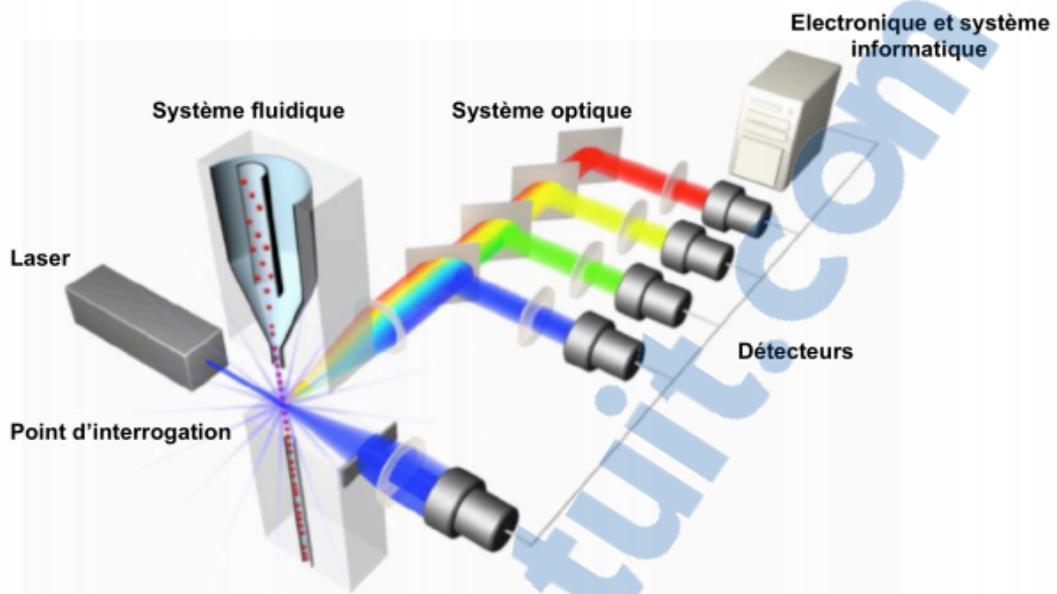


Figure 4 : Composants majeurs d'un cytomètre en flux

Le cœur du système est représenté par le point d'interrogation. En effet, c'est là que les cellules traversent le ou les lasers et que le système optique collecte la lumière diffractée et la fluorescence émise par la cellule. Le passage des cellules les unes derrière les autres, réalisée par le principe de centrage hydrodynamique est primordial pour une analyse précise des signaux optiques.

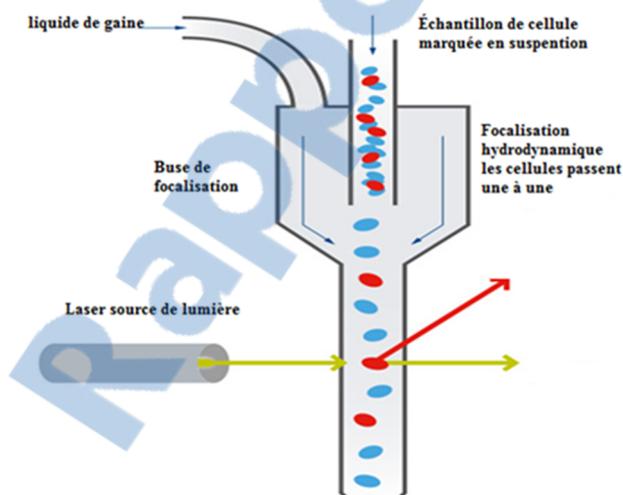


Figure 5 : Application de la focalisation hydrodynamique, pour réaliser le défilement rapide et centré des cellules dans le cytomètre en flux.

14.2.2 Collecte des signaux optiques cellulaires

Le cytomètre en flux analyse les cellules en les faisant défile à grande vitesse à travers un ou plusieurs lasers. Les signaux optiques émis par la cellule coupant le faisceau lumineux d'un laser sont mesurés par le cytomètre. Ils sont essentiellement relatifs aux propriétés optiques intrinsèques des cellules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la cellule et à la structure interne. La taille relative (FSC) et la granularité relative (SSC) des cellules sont ainsi mesurées. Les signaux sont également relatifs aux propriétés optiques induites par la fluorescence obtenue par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires. En général, des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes sont nécessaires pour ces mesures optiques. Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et réémet l'énergie absorbée par vibration et dissipation de chaleur, d'où une émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée. Ces signaux, séparés par des filtres optiques, sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.

14.2.2.1 Le système optique :

Le système optique d'un cytomètre en flux se compose de deux parties, la partie optique d'excitation et la partie optique de collecte.

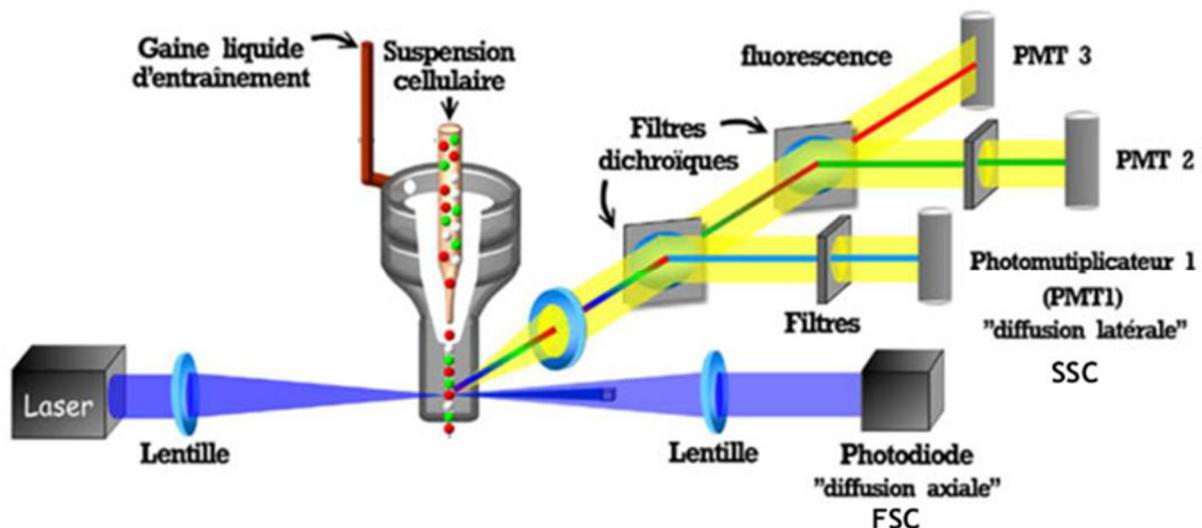


Figure n° 6 : Schéma d'un cytomètre de flux

14.2.2.1.1 L'excitation lumineuse

Le système optique implique une source lumineuse qui est souvent composée d'un ou de plusieurs lasers. Le laser a l'avantage d'être une lumière monochromatique très fine, qui excite spécifiquement un fluorochrome ayant une longueur d'onde déterminée. Les cellules excitées par la lumière du laser, induisent une émission de fluorescence des fluorochromes utilisés pour le

marquage [33]. Plusieurs types de laser peuvent être utilisés comme source d'excitation lumineuse. En CMF, les lasers les plus couramment utilisés sont des lasers à base d'Argon qui fournissent plusieurs raies d'excitation, en particulier deux raies de forte puissance, l'une de 488nm qui est la plus utilisée, et la seconde de 514nm [45].

14.2.2.1.2 La collecte des signaux

De l'interaction entre le faisceau du laser et les particules à analyser, résulte des signaux lumineux de diffusion de deux catégories. La première, composée de signaux lumineux de diffusion aux petits angles (figure7) collectée dans l'axe du faisceau du laser et correspondant d'un point de vue physique à la diffraction. Ils donnent une indication sur la taille des particules analysées [39]. Ce paramètre est appelé forward-scatter (FSC) [45]. La seconde catégorie se compose de signaux lumineux de diffusion aux grands angles, collectés à 90° par rapport au faisceau lumineux. Ils sont un mélange de diffusion, de réflexion et de réfraction et donnent des indications sur la granularité interne des cellules. Ce paramètre est appelé sidescatter (SSC) [45]. Les deux paramètres FSC et SSC sont très utilisés pour distinguer les sous-populations cellulaires du sang. Par exemple le signal est faible en SSC et FSC pour les lymphocytes, légèrement plus fort pour les monocytes et très élevé pour les granulocytes. En associant les deux types de diffusion et en absence de tout marquage, il est ainsi possible de séparer les différentes sous-populations en CMF [45].

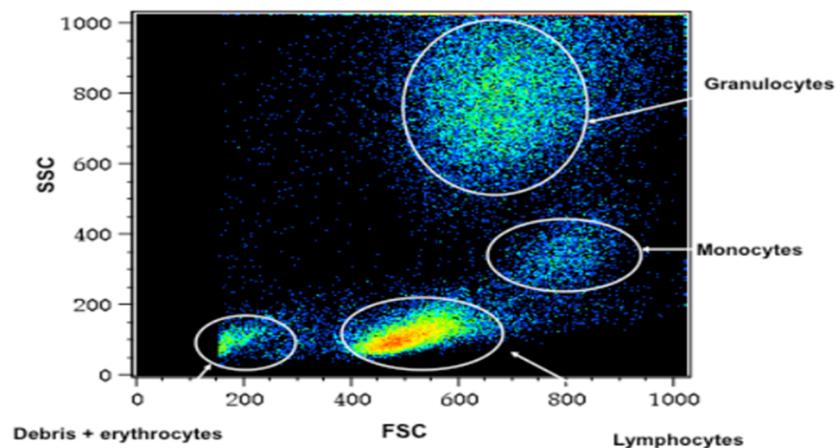


Figure 7 : Identification des leucocytes dans le sang total

Lorsque les cellules marquées par des fluorochromes sont excitées, elles émettent des signaux lumineux qui sont collectés par un système optique. Les fluorochromes sont des substances capables, quand elles reçoivent un rayonnement incident d'une certaine longueur d'onde (longueur d'onde d'excitation), réémettent une radiation de longueur d'onde supérieure

(longueur d'onde d'émission) lors du retour à l'état de repos [38]. La fluorescence est collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux (figure 8). Les signaux sont collectés et dirigés vers les détecteurs grâce à un ensemble d'équipement optique, constitué d'une lentille de collection, de miroirs dichroïques et de filtres pour diriger les longueurs d'onde de la lumière collectée vers les détecteurs appropriés [45].

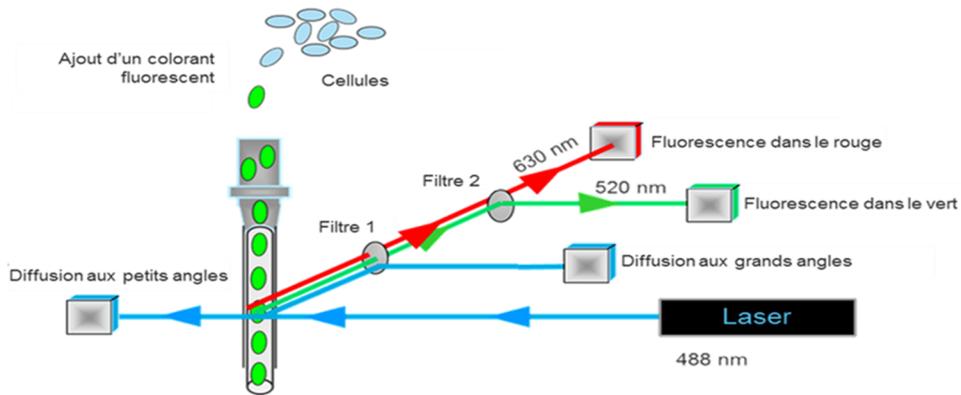


Figure 8 : Collecte des signaux par le système optique du cytomètre

14.2.2.2 Les miroirs dichroïques et les filtres

Les miroirs dichroïques sont des diviseurs optiques. Ils séparent la lumière composée de différentes longueurs d'onde en la dirigeant vers les différents photomultiplicateurs (PMT). Un miroir est une surface réfléchissante. Suivant le traitement de sa surface, on peut obtenir des miroirs de passe-haut et de passe-bas [45]. Un miroir de passe-bas transmet les longueurs d'ondes inférieures à 560nm et réfléchit les longueurs d'ondes supérieures à 560nm, tandis qu'un miroir de passe-haut agit dans le sens inverse [45].

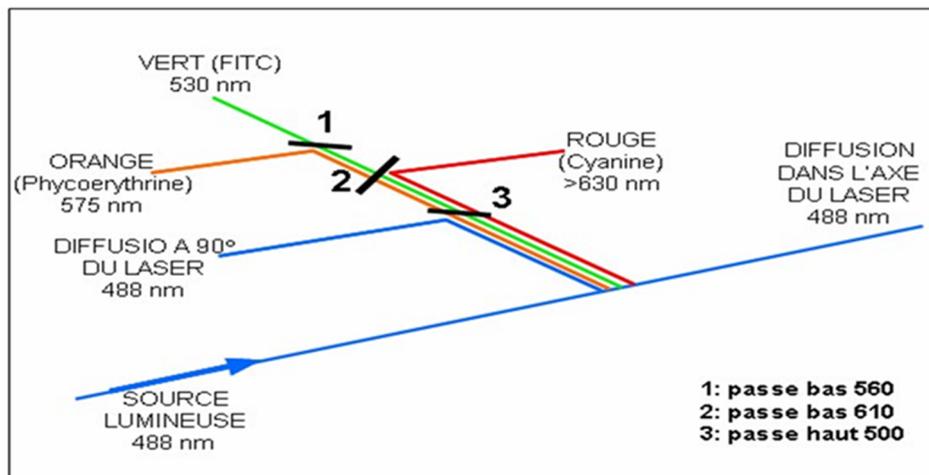


Figure 9: Exemple de trajet optique dans un cytomètre en flux

Ensuite la collection de la fluorescence se fait à travers des filtres disposés devant les photorécepteurs. On peut ainsi définir trois types de filtres, les filtres passe-haut, passe-bas et passe-bande (figure 10). Le rôle d'un filtre ou d'un miroir est fondamental, car il permet de sélectionner la frange du signal lumineux à transmettre, de réfléchir, de séparer afin que chaque détecteur capte uniquement les longueurs d'ondes qui lui sont destinées.

Les filtres de passe-haut laissent passer la lumière au-dessus d'une certaine longueur d'onde. Exemple celui de 500 nm, arrête les longueurs d'ondes situées en dessous de 500 nm, et permet uniquement la transmission des longueurs d'ondes supérieures et vice-versa pour les filtres de passe-bas [45]. Les filtres les plus utilisés en CMF sont les filtres de passe-bande. Ce type de filtre laisse passer la lumière comprise entre deux longueurs d'onde. Ils permettent une meilleure collection de diverses fluorescences. Ils sont caractérisés par une excellente transmission selon une bande spectrale de lumière qui est centrée sur le pic d'émission du fluorochrome [45].

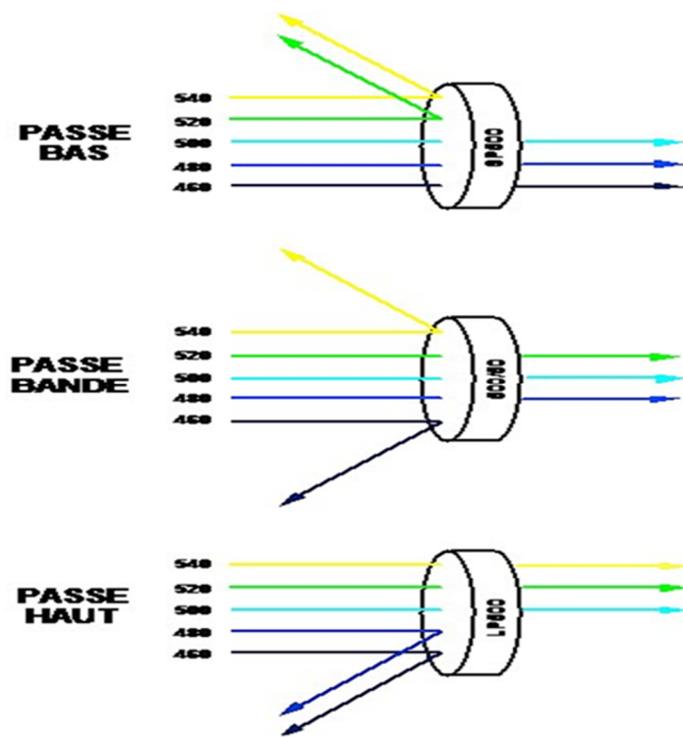


Figure 10 : Les filtres

14.2.2.3 Le système électronique

14.2.2.3.1 Traitement du signal

Après avoir traversé cette succession de miroirs et de filtres, la lumière est recueillie et transformée en signal électrique par un photomultiplicateur ou une photodiode, puis elle est

digitalisée, enregistrée et traitée par un ordinateur. Deux types de détecteurs sont présents dans le cytomètre, les photodiodes(PD) et les PMT.

14.2.2.3.2 La conversion des signaux :

L'ordinateur ne peut traiter ces données que si elles sont sous forme binaire (signal digital). Le traitement électronique du signal, est réalisée par un convertisseur analogique-digital (ACD) [45].

14.2.2.3.3 Présentation des résultats :

Les valeurs numériques issues des convertisseurs sont stockées par le système informatique et présentées sur les écrans des cytomètres sous deux formes [41] (figure 11), des histogrammes monoparamétriques, où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules, et des histogrammes biparamétriques ou cytogrammes présentant deux signaux simultanément.

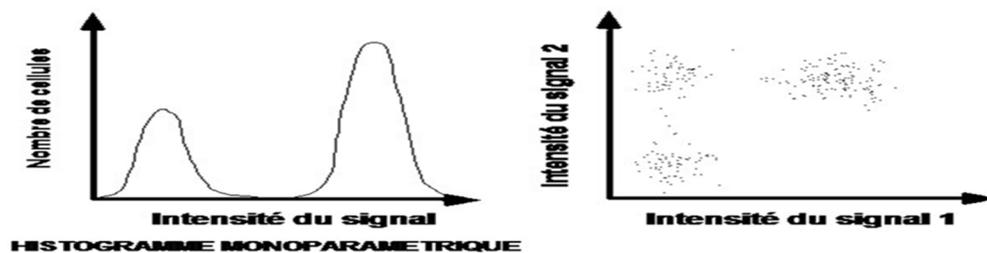


Figure 11 : Présentation des résultats en cytométrie en flux.

14.2.3 La fluorescence :

La fluorescence est un phénomène de luminescence qui désigne la propriété que vont avoir certaines molécules pour émettre des photons lors de leur désexcitation depuis un état électronique excité.

14.2.3.1 Le fluorochrome

Le fluorochrome sert simplement d'étiquette fluorescente pour un marqueur dont le site de fixation cellulaire est connu. Les ligands les plus utilisés sont les anticorps monoclonaux.

14.2.3.2 Caractéristiques spectrales

L'intensité de la fluorescence est liée directement à l'intensité de l'excitation et aux capacités d'absorption du fluorochrome à la longueur d'onde choisie.

Chaque fluorochrome est caractérisé par un spectre d'absorption ou d'excitation et un spectre d'émission de fluorescence. C'est en se référant à ces spectres que se fait le choix de la raie du laser la plus efficace pour l'excitation, le filtre le mieux adapté pour une collection spécifique de la fluorescence, ainsi que le choix des fluorochromes à utiliser pour éviter les chevauchements de spectres.

14.2.3.3 Le marquage avec les anticorps fluorescents

Il existe différents types de marquage des cellules. Le marquage direct au cours duquel les cellules sont incubées avec un anticorps directement conjugué à un fluorochrome (par ex. FITC). Ceci a pour avantage d'exiger une seule étape d'incubation d'anticorps et élimine la possibilité d'une liaison non spécifique à partir d'un anticorps secondaire [42]. Le marquage indirect où l'anticorps primaire n'est pas marqué par un fluorochrome, mais il est détecté par un anticorps secondaire marqué par un fluorochrome. Ce second fluorochrome peut être un anticorps qui a une spécificité pour le premier anticorps (figure12) [42].

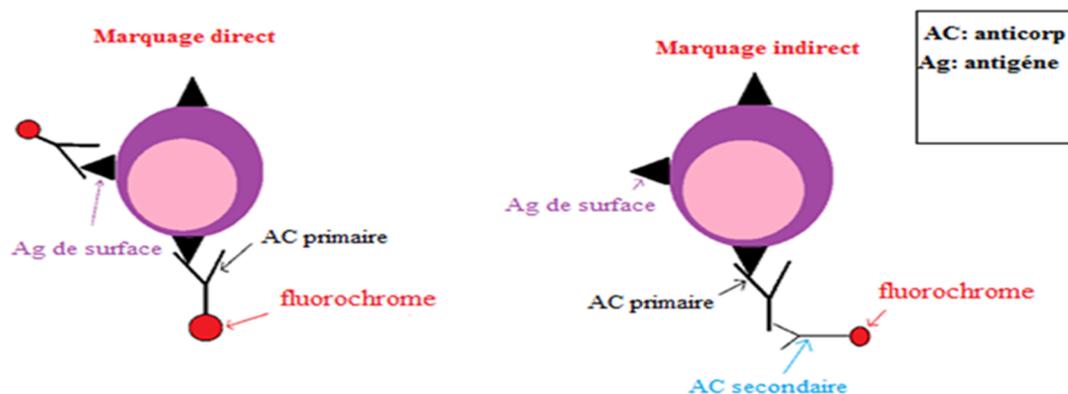


Figure 12 : Illustration de marquage direct et indirecte des cellules

Enfin, le marquage intracellulaire où la coloration des antigènes intracellulaires pour les protocoles de cytométrie en flux dépend de diverses méthodes de fixation et de perméabilisation pour permettre l'accès des anticorps aux protéines cellulaires internes [42].

14.2.4 Technique d'analyse :

La CMF est une technique qui doit permettre une caractérisation des cellules analysées et l'identification de sous-population au sein d'une population complexe et hétérogène et ceci est rendue possible grâce à l'amélioration des logiciels utilisés.

Une fois que les données sont collectées et transférées dans un format numérique, elles sont prêtes à être analysées à l'aide d'un logiciel informatique. Les sous-ensembles de données peuvent être définis par un gating. C'est une délimitation numérique ou graphique utilisée pour isoler des sous-populations de particules ou de cellules, afin de les analyser par rapport à leurs caractéristiques morphologiques et fluorescentes.

14.2.5 Le réglage du cytomètre

Avant d'analyser l'échantillon en cytométrie, on doit optimiser les réglages du cytomètre et être en adéquation avec le type de marquage et le type de cellules qui seront analysées. Ces différents réglages concernent les PMT, le seuil et les compensations.

15. APPLICATION DE LA CMF DANS LA MRD

Le MM reste une maladie maligne incurable à ce jour, avec un échappement thérapeutique inéluctable. A cet égard, il paraît nécessaire d'élaborer des stratégies de détection de la MRD en utilisant des méthodes plus sensibles, comme la CMF, pour une meilleure évaluation et surveillance de la MRD. En raison de sa faisabilité, l'analyse immunophénotypique par cytométrie en flux est la méthode retenue pour analyser et rechercher la maladie résiduelle chez les patients suivis pour myélome, traités par chimiothérapie suivie d'une intensification et qui ont atteints le J100 après autogreffe de cellules souches périphériques. Il a été démontré que la CMF a une approche particulièrement bien adaptée pour étudier des échantillons biologiques contenant des plasmocytes. Elle permet l'évaluation d'un nombre élevé de cellules en quelques heures seulement et une identification et caractérisation simultanée des plasmocytes avec leurs niveaux d'expression antigénique extracellulaires et intracellulaires. La première tentative de la recherche de la MRD dans le MM par cytométrie en flux a été réalisée en 2002 par Rawstron puis les travaux ont été publiés en 2008 [40] dans le Rapport du Réseau Européen du myélome, qui rapportait le panel des antigènes les plus fréquemment utilisés pour la détection des plasmocytes néoplasiques et normaux (tableau 10).

Antigènes	Expression normale (pourcentage d'expression dans les PCN)	expression anormale	Utilité pour le monitoring et suivi
CD19	Positif (> 70%)	Négatif 95%	Nécessaire
CD56	Négatif (<15%)	Fortement positif (75%)	Nécessaire
CD117	Négatif (0%)	Positif 30%	Recommandé
CD20	Négatif (0%)	Positif 30%	Recommandé
CD 27	Fortement positif 100%	Négatif 40 à 50%	Recommandé
CD28	Positivité faible (<15%)	Positif 14-35%	Recommandé

Tableau 10 Liste des antigènes de surface utiles pour la détection des Plasmocytes CD38 +, CD138 + normaux et anormaux dans les MG.

Il s'agissait du premier consensus qui établissait la reproductibilité de la MRD dans le MM, et les exigences de lancer une enquête pour identifier un panel commun pour évaluer la MRD par CMF. Ensuite, plusieurs recherches ont été menées, parmi les plus importantes, celles de Bruno Paiva et celle d'Arroz M et al [38, 45] qui ont mis l'accent sur l'importance de la MRD dans le MM et qui ont démontré que l'utilisation combinée de CD138 et CD38, conjointement avec les anticorps CD45, CD19, CD56, CD27, CD81 et CD117 était la mieux adaptée pour la surveillance de la MRD dans le MM. L'évaluation de la clonalité des chaînes κ par rapport au chaînes λ , pouvait contribuer à établir davantage la nature clonale des petites populations.

ETUDE PRATIQUE

1 PROBLEMATIQUE

L'évolution récente des traitements du MM a permis une nette amélioration de l'efficacité thérapeutique, associée à la fois à une augmentation du taux de rémission et une diminution progressive du nombre de cellules malignes résiduelles. En parallèle, il est devenu indispensable de disposer de critères de plus en plus stricts et de techniques de plus en plus sensibles et spécifiques afin d'évaluer la réponse au traitement et la maladie résiduelle.

En effet, les critères de réponse de l'IMWG, ont longtemps été basés sur la RC, la bonne réponse complète et la RC stringente. Ces différentes phases de réponse ne reflètent malheureusement pas la nature et la profondeur de la réponse, car leurs évaluations portent sur des critères biologiques (le composant monoclonal et les chaînes libres) et cytologiques (la plasmocytose médullaire).

Aujourd'hui, comme dans la plupart des affections hématologiques malignes, la recherche et l'évaluation de la maladie résiduelle sont devenues incontournables. Cette évaluation de la MRD est basée actuellement sur des examens de biologie moléculaire (recherche de transcrite ou de mutation de gènes) et/ou d'immunophénotypage par cytométrie en flux (recherche de marqueurs phénotypiques aberrants ou spécifiques de cellules malignes).

Au cours du MM, l'évaluation de la MRD est basée sur la recherche des marqueurs phénotypiques des plasmocytes malins. L'utilisation de la CMF semble avoir ainsi, toute sa place puisqu'elle permet de quantifier les cellules malignes résiduelles avec une sensibilité et une spécificité tout à fait adaptées à la pratique clinique.

La CMF a également l'avantage d'être de réalisation plus rapide et plus facilement applicable à grande échelle. Il est de ce fait raisonnable de penser que l'évaluation de la MRD par CMF devienne la méthode de référence en clinique, mais cet objectif nécessite encore des études afin d'aboutir à une standardisation de la CMF et une application en routine.

A l'échelon local, l'évaluation de la réponse post-thérapeutique au cours du MM est basée sur la quantification du composant monoclonal ainsi que sur la plasmocytose médullaire, alors que dans les autres hémopathies malignes (leucémies aiguës, LLC), la réponse est évaluée par la cytométrie en flux. L'avènement de la CMF pour l'évaluation de la réponse dans le MM, nous a incités à étendre son indication au niveau local.

2. OBJECTIFS

2.1 Objectif primaire

L'objectif de ce travail est la mise au point de la technique d'évaluation de la MRD au cours du MM en réponse, au niveau du service d'Hématologie et de Thérapie Cellulaire de l'EHU 1^{er} Novembre d'Oran.

2.2 Objectif secondaire

Utilisation des résultats obtenus de la MRD par la CMF dans le suivi des patients atteints de MM.

3. PATIENTS ET METHODES

3.1 Type de l'étude

Il s'agit d'une étude originale, longitudinale, prospective, qui a débuté en février 2015 et a pris fin en décembre 2017. Il s'agit d'une étude clinico-biologique, comportant une première partie portant sur la mise en place de la technique de la MRD par la cytométrie en flux et une deuxième partie, portant sur l'évaluation de la MRD chez les patients atteints de MM et ayant subi une autogreffe de CSH.

3.2 Patients

3.2.1 Critères d'inclusion

L'étude a intéressé les patients, âgés de moins de 65 ans, présentant un MM durant la période allant de février 2015 à juillet 2017. Le traitement d'induction a porté sur une chimiothérapie de type VAD, VD ou VTD (tableau13). Les patients éligibles à une intensification et autogreffe de CSH et ayant été évalués pour la réponse à J100 ont été inclus dans cette étude.

3.2.2 Critères d'exclusion

Ont été exclus de cette étude, tous les patients âgés de plus de 65 ans et ceux âgés de moins de 65 ans traités pour MM mais non éligibles à une autogreffe, et les patients qui n'ont pas atteint le J100 après la greffe, à la date de point.

3.2.3 Données cliniques et biologiques analysées

Les données cliniques ont été obtenues par recherche dans les dossiers médicaux des patients (tableau 11).

Sexe
Age
Protidémie
Albuminémie
Type et Concentration du composant monoclonal
Immunofixation
Le pourcentage de plasmocytes dans la moelle osseuse
Le bilan radiologique
Le taux d'hémoglobine
Créatinémie
β2m sérique
Calcémie
Le stade de la maladie selon la classification de Durie et Salmon
Le stade de la maladie selon la classification ISS
Le type de chimiothérapie
L'intensification et autogreffe de CSH
La réponse au traitement selon les critères de l'IMWG
Statut au J100 post Autogreffe

Tableau 11: Fiche de renseignement clinique et thérapeutique

3.3. Méthodologie

3.3.1 Diagnostic du MM

Le diagnostic de MM a été établi sur des arguments cliniques, essentiellement représentés par l'altération de l'état général, les douleurs osseuses, les troubles neurologiques liés aux tassements vertébraux et la pâleur cutanéomuqueuse, sur des arguments biologiques, qui sont l'hyperprotidémie, la présence d'un composant monoclonal à l'électrophorèse des protéines sériques et/ou urinaires, sur des arguments cytologiques, quantitatif et qualitatif, qui est la plasmocytose médullaire et les dystrophies morphologiques des plasmocytes malins et enfin sur la mise en évidence de lésions osseuses radiologiques. L'immunosélecton a été indiquée pour le typage du composant monoclonal.

3.3.2 Classifications adoptées

Une fois le diagnostic posé, les patients ont été stadifiés selon la classification de Durie et Salmon et la classification ISS (tableau12)

Classification de Durie & Salmon

Masse tumorale Critères requis	<u>Stade I</u> faible tous	<u>Stade II</u> intermédiaire ni I ni III	<u>Stade III</u> forte au moins un
<u>Protéine M</u>			
sérique	IgG < 50 g/L IgA < 30 g/L		IgG > 70 g/L IgA > 50 g/L
urinaire	PBJ < 4 g/24 h		PBJ > 12 g/24 h
<u>Hémoglobine</u>	> 10 g/dL		< 8,5 g/dL
<u>Calcémie</u>	< 3 mmol/L (120 mg/L)		> 3 mmol/L (120 mg/L)
<u>Lésions osseuses</u>	≤ 1		> 3
<u>Sous-classification</u>			
- A définit une fonction rénale préservée (créatininémie < 175 μmol/L soit 20 mg/L)			
- B définit une insuffisance rénale (créatininémie ≥ 175 μmol/L soit 20 mg/L)			

Classification ISS

Stade	I	II	III
<u>Critères</u>	β ₂ m sérique < 3,5 mg/L et albuminémie > 35 g/L	ni I ni III	β ₂ m sérique > 5,5 mg/L

Tableau12 : Classifications DS et ISS

3.3.3 Bilan des complications

Certaines complications fréquentes au cours du MM ont été recherchées systématiquement afin d'être rapidement prisent en charge. Il s'agit plus particulièrement de l'anémie, des complications neurologiques liées à la lyse osseuse, des complications orthopédiques et des complications rénales.

3.3.4 Indications thérapeutiques

Les patients inclus dans l'étude présentaient tous un MM symptomatique au vu des éléments cliniques et biologiques et nécessitaient ainsi un traitement approprié.

3.3.5 Bilan préthérapeutique

Un bilan préthérapeutique a été effectué avant l'instauration du traitement. Il a comporté un bilan biologique, hépatique, rénale, glycémie, phosphocalcique et un groupage sanguin avec sérologies HIV, HBS, HCV, TPHA. Un électrocardiogramme et une échographie cardiaque ont été pratiqués afin d'évaluer l'état cardiaque du patient et d'apprécier la fraction d'éjection

ventriculaire. Un dosage des β HCG chez les femmes en âge de procréer, ainsi qu'une radiologie panoramique dentaire avant la prescription des biphosphonates, ont été réalisés.

3.3.6 Le traitement

3.3.6.1 Traitement symptomatique

3.3.6.1.1 Traitement de l'anémie

L'indication de la transfusion a tenu compte de l'hémodilution, du taux d'hémoglobine, de l'état clinique du patient et des signes de tolérance. Le seuil retenu est de 8g/dl. L'érythropoïétine a été prescrite devant des taux d'hémoglobine compris entre 8g/dl et 10g/dl sans dépasser 12g/dl.

3.3.6.1.2 Traitement de la douleur

Le traitement anti tumoral est la meilleure indication pour lutter contre la douleur. En attendant son effet, les antalgiques ont été prescrits selon l'échelle des antalgiques de l'OMS (74).

Les biphosphonates ont été prescrits avant chaque cure de chimiothérapie. Les principales molécules utilisées sont l'acide Zoledronic et le Pomidronate. La radiothérapie à visée antalgique a été indiquée devant des douleurs rebelles aux antalgiques et secondaires à une compression médullaire.

3.3.6.1.3 Traitement orthopédique

Le recours au traitement orthopédique a été indiqué en cas de fractures pathologiques et en cas de lésions osseuses instables, associé au port d'un lombostat.

3.3.6.1.4 Traitement des infections

Une prophylaxie antivirale, par acyclovir à raison de 400mg/j, ainsi qu'une antibiothérapie à base de Sulfaméthoxazole/Triméthoprim et ciprofloxacine et un traitement antifongique, à base d'amphotéricineB, ont été prescrits en cas d'une autogreffe de CSH. En cas de foyer infectieux patent, un traitement adapté est alors institué selon le germe mis en cause (bactérien, viral ou parasitaire).

3.3.6.1.5 Traitement de l'hypercalcémie

L'hypercalcémie a été traitée par une hyperhydratation à raison de 3l/24h, une corticothérapie à raison de 200 à 300 mg d'hydrocortisone intraveineux pendant 3 à 5 jours, des biphosphonates tel que le clodronate à la dose de 4 à 6 mg/kg en intraveineuse lente de 2 à 5 heures, pendant 3 à 5 jours ou en injection unique sur 2 à 9 heures ou le pamidronate en perfusion lente de 15 à 45 mg·j-1 pendant 6jours et l'instauration d'une chimiothérapie d'induction.

3.3.6.1.6 Traitement de l'insuffisance rénale

L'insuffisance rénale a été réversible après la prescription d'un traitement spécifique et d'un traitement symptomatique basé sur une hydratation hydro-sodée de 3l/J, une alcalinisation des

urines PH>7 et la correction des facteurs favorisants (déshydratation, hypercalcémie, infections urinaires).

3.3.6.1.7 Prophylaxie et traitement des thromboses

La prescription du traitement anti thrombotique a été guidée par les facteurs de risque.

Facteur de risque	Recommandation
Si aucun facteur de risque ou présence d'un seul facteur de risque	Aspirine 81 à 325 mg une fois par jour
Si deux ou plusieurs facteurs de risque	-HBPM : *Enoxaparine (Lovenox®) : 0,4 ml / jour *Tinzaparine (Innohep®) : 3500 UI à 4500 UI / jour -Warfarine à pleine dose : le rapport normalisé international (INR) 2-3 est recommandé.

Tableau 13: Recommandations pour la prophylaxie de la thrombose

3.3.6.2 Traitement spécifique

En raison de l'hétérogénéité du recrutement des patients, provenant de différents centres d'hématologie du territoire national, le protocole de chimiothérapie d'induction institué a varié d'un centre à l'autre.

3.3.6.2.1 Chimiothérapie d'induction

Les protocoles de chimiothérapie utilisés sont reportés au niveau du tableau ci-dessous.

Protocoles	Drogues J1=J28
PAD	VELCADE 1,3 mg/m ² J1 J4 J8 J11 IV. ADRIBLASTINE 36 mg/m ² J1 IV. DECTANCYL 40 mg J1 J4 J8 J11 po
VAD	ONCOVIN 0,4 mg/j J1 à J4 IVC. ADRIBLASTINE 9 mg/m ² /j J1 à J4 IVC. DECTANCYL 40 mg/j J1 à J4 po
VCD	VELCADE 1,3 mg/m ² J1 J8 J15 J22 IV. ENDOXAN 300 mg/m ² (500 mg max) J1 J8 +/-J15 IV. DECTANCYL 40 mg/semaine.
VTD	VELCADE 1 mg/m ² J1 J4 J8 J11 IV. DECTANCYL 40 mg/j J1 à J4 po. THALIDOMIDE 100 mg/j po en continu.
VD	VELCADE 1,3 mg/m ² /j J1 J4 J8 J11 IVD. DECTANCYL 40 mg/j J1 à J4 po
MP	Melphalan : Per os (MP et dérivés) : 0,25mg/kg 4jours/mois et Corticoïdes 2 mg/kg/j J1 à J4 po.

Tableau14 : Protocoles de chimiothérapie d'induction

Selon le protocole utilisé, les patients ont reçu 4 cures avant qu'ils ne soient évalués et proposés à une intensification suivie d'une autogreffe de CSH.

3.3.6.2.2 Intensification et autogreffe de CSH

Après une consultation pré-greffe, ayant pour objet d'étudier l'éligibilité du patient à l'autogreffe, ce dernier est hospitalisé au niveau de l'Unité d'autogreffe de l'EHU d'Oran. L'hospitalisation a lieu dans une chambre individuelle dite protégée avec traitement de l'air ambiant par plasmair® et soumise à des mesures d'hygiène rigoureuses.

3.3.6.2.2.1 La phase de mobilisation

La mobilisation des cellules souches périphériques débute le lendemain de l'hospitalisation du patient, par un facteur de croissance cellulaire, administré en sous cutané, du G-CSF, à la dose de 15µg /kg/jour pendant 5 jours de J-6 à J-2 à 6 heures. A noter que les patients ont été mis sous Lovenox à raison de 0,2 ml en sous cutané toutes les 12 heures dès le J-4.

3.3.6.2.2.2 Cytaphérèse des CSH

Après la mise en place d'un cathéter central, le prélèvement des CSH par cytaphérèse, est débuté à J-2 et J-1 à l'aide d'un appareil d'aphérèse de type OPTIA®.

3.3.6.2.2.3 La quantification et conservation des CSH (CD34⁺)

La quantification des CD34⁺ a été réalisée grâce à un cytomètre de type BECTON DICKINSON à 8 couleurs. Le seuil minimal ciblé de CD34⁺ est de 2×10^6 /kg.

Après le recueil effectué à 8h du matin, les CSH sont conservées pendant 24 h au réfrigérateur à +4°C. La viabilité des CSH (CD34⁺) a été calculée par le cytomètre en flux à l'aide d'un marqueur de viabilité cellulaire, le 7'AAD (7 Aminoactinomycine D).

3.3.6.2.2.4 Le conditionnement ou intensification

Le conditionnement a été réalisé par du Melphalan à haute dose, entre 140 et 200mg/m² à J-1 selon l'état rénal du patient avec l'administration en pré, per et post du melphalan par une cryothérapie à base de glaçons à sucer.

3.3.6.2.2.5 Perfusion des CD34⁺

La perfusion du greffon est réalisée à J0, 24h après la fin de la perfusion du melphalan haute dose. L'administration des CSH est précédée d'une prémédication à base de paracétamol, de la dexchlore phéneranyl ou d'hydrocortisone.

3.3.7 Gestion de la phase d'aplasie

La phase d'aplasie est secondaire à l'intensification par le melphalan haute dose. Cette phase d'aplasie est caractérisée par une leuco-neutropénie profonde, une anémie sévère et une thrombopénie inférieure à 20.000/mm³. Pour la gestion de la leuco-neutropénie, un traitement anti-infectieux prophylactique est instauré à partir de J-2 jusqu'à la sortie d'aplasie associant du sulfaméthoxazole/triméthoprim 1cp/j, du ciprofloxacine1cp/j, de l'amphotericineB, du fluconazole1cp/j, de l'acyclovir à raison de 400mg/j ainsi que des bains de bouche à l'aide

Bétadine, répétés plusieurs fois par jour. L'anémie et la thrombopénie sont traitées par les produits sanguins labiles, tels, les culots globulaires et les culots plaquettaires d'aphérèse irradiés. La prévention des troubles métaboliques, est assurée par une hyper hydratation à raison de 3 l/m² avec un contrôle régulier de la diurèse, effectué quotidiennement. Par ailleurs, un contrôle biologique est effectué 3 fois par semaine. Il comporte une FNS, un ionogramme, une CRP et une créatinémie.

En cas d'infection avérée, un traitement adapté est alors institué selon la recherche du germe en cause par des hémocultures et/ou des prélèvements au niveau des orifices naturels et l'imagerie. La sortie de la phase d'aplasie est attestée sur la remontée du taux de PNN, de celui des plaquettes et accessoirement de celui de l'hémoglobine.

3.3.8 Evaluation de la réponse post autogreffe à J100

L'évaluation de la réponse est réalisée à J100 selon les moyens conventionnels et selon la quantification de la MRD par CMF.

3.3.8.1 Les moyens conventionnels d'évaluation de la réponse

L'évaluation de la réponse post autogreffe de CSH, s'est basée sur l'examen clinique, la protidémie, l'électrophorèse des protéines sanguines et/ou urinaires avec une immunosélecton ainsi que le dosage des chaînes libres sériques et urinaires.

3.3.8.2 La quantification de la MRD par CMF

Tous les patients ayant achevés leurs programmes thérapeutiques, comportant une induction et une autogreffe de CSH, ont été convoqués à J100 pour une évaluation post autogreffe, par, d'une part les moyens conventionnels et d'autre part, pour une analyse en cytométrie de flux pour une quantification de la MRD. Cette dernière, a comporté une phase de prélèvement et une phase d'analyse.

3.3.8.2.1 La phase de prélèvement

L'immunophénotypage par CMF a été réalisé à partir d'échantillons de moelle osseuse. La moelle osseuse a été prélevée stérilement par aspiration à l'aide d'un trocart au niveau sternal, après désinfection soigneuse du site de prélèvement et éventuellement une anesthésie locale (EMLA®). Le prélèvement de moelle a été placé dans un tube contenant l'anticoagulant de type EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) destiné à l'immunophénotypage plasmocytaire en CMF. La quantité prélevée est de 2 ml pour l'analyse. Le tube est immédiatement homogénéisé par une série de retournements lents, pour incorporer l'anticoagulant à la moelle qui a tendance à coaguler facilement. Un étalement sur lames pour une étude cytologique, plus particulièrement pour une appréciation de la richesse médullaire et du taux de plasmocytes, a été réalisé à chaque prélèvement pour contrôler sa qualité. Les prélèvements destinés à l'immunophénotypage

plasmocytaire par CMF sont ainsi adressés rapidement au laboratoire de l'unité de thérapie cellulaire du Service et maintenus à température ambiante à environ +20°C.

3.3.8.2.2 La phase d'analyse par la cytométrie en flux

3.3.8.2.2.1 Le cytomètre utilisé BD FACSCantoII

L'appareil utilisé dans ce travail est un cytomètre BD FACSCanto™ II. Il est équipé de trois lasers comme source d'excitation. Un laser bleu à 488 nm, rouge à 633 nm et un laser Violet à 405 nm. Le BD FACSCanto II peut détecter jusqu'à 8 couleurs simultanément ainsi que 2 paramètres physiques (figures 13 et 14).

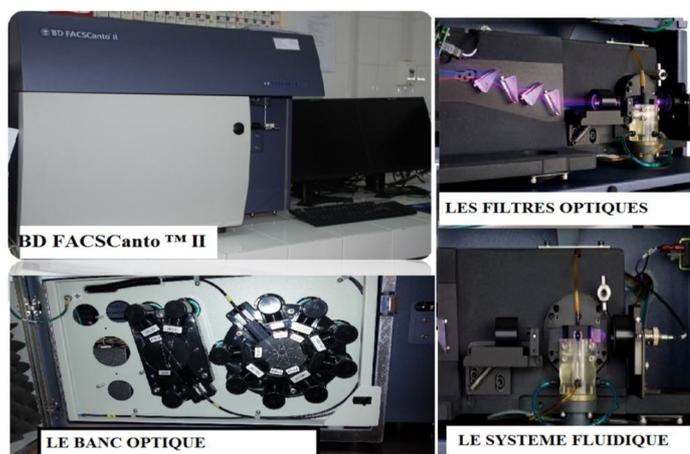


Figure13: Cytomètre BD FACSCanto©

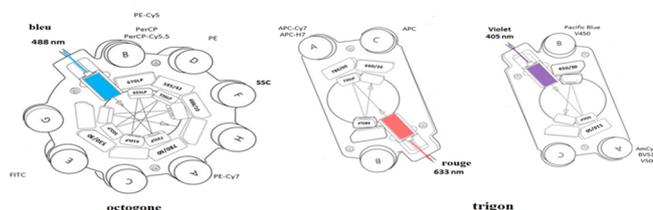


Figure 14 : Le banc optique du BD FACSCanto II

3.3.8.2.2.2 Réglage de l'appareil

L'utilisation de microbilles de BD permet de caractériser le cytomètre selon le panel créé. Cette étape est réalisée dans le but d'ajuster les lasers, de déterminer les voltages des PMT et les compensations par un calcul automatique effectué par le logiciel BD FACS Diva.

3.3.8.2.3 Validation de la technique

3.3.8.2.3.1 Les témoins

Lors de cette étude, afin d'évaluer la spécificité de la technique, nous avons tout d'abord réalisé l'immunophénotypage de deux témoins, positif et négatif. Ceci a permis la distinction entre les PC normaux et néoplasiques sur le témoin positif, ainsi que l'absence des PC néoplasiques sur le

témoin négatif. La même stratégie d'analyse est utilisée pour les deux témoins, basée sur une exclusion de la majorité des évènements contaminants. Une analyse immunophénotypique précise par rapport aux AC aberrants afin de mettre en évidence l'expression du CD56, l'absence d'expression du CD19 et du CD27 pour les PC pathologiques et le manque d'expression du CD56 avec une expression du CD19 et du CD27 pour les PC normaux.

3.3.8.2.3.1.1 Le témoin négatif

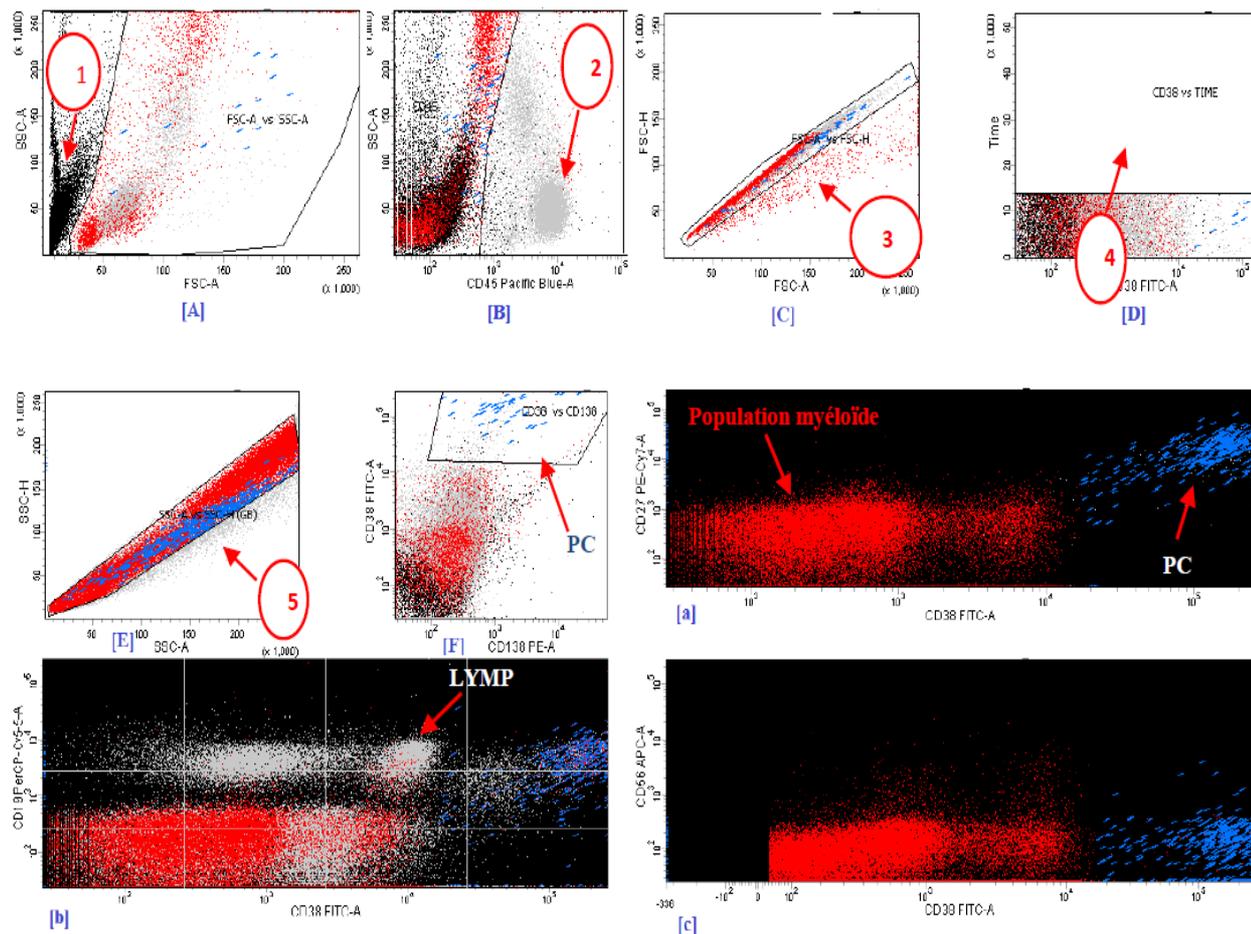


Figure 15 : Stratégie de gating initial pour identifier les PC. ©

(1) les débris, (2) les lymphocytes, (3) les doublés selon la taille cellulaire, (4) la continuité et la stabilité de l'acquisition d'échantillon, (5) les doublés selon la structure des cellules.

Les régions sur les dots plots : [A] : Elimination des débris selon les deux paramètres de taille et structure cellulaire. [B] : Une élimination des lymphocytes en fonction de leur expression forte en CD 45.

[C, E] : Elimination des doublés selon la taille et la structure des cellules. [D] : Mesure de la qualité et de la continuité des données acquises pour l'ensemble de l'échantillon. [F] : Toutes les cellules plasmatiques possibles sont capturées par une région sur les évènements qui sont CD38 + et CD138 + .Les témoins internes : [a] [b] [c]. Les PC normaux (bleu), La population myéloïde (rouge), les lymphocytes (population grise).

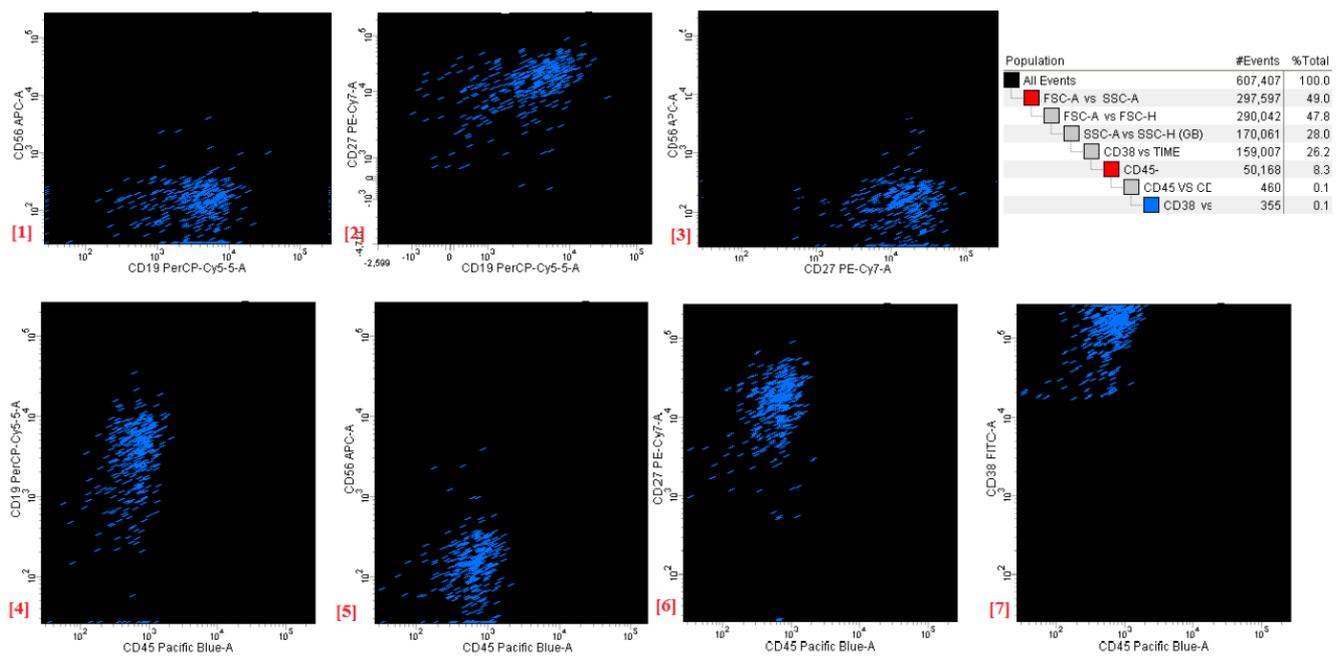


Figure 16: Présentation d'une analyse immunophénotypique d'un témoin négatif. .©

[1] : PC (CD19+, CD56-). [2] : PC (CD19+, CD27+). [3] : PC (CD27+, CD56-). [4] : PC (CD45, CD19+). [5] : PC (CD45-, CD56-). [6] : PC (CD45-, CD27+). [7] : PC (CD45-, CD38+).

L'analyse de ces données montrent que l'échantillon ne contient que des cellules plasmatiques de phénotype (CD19 +, CD27+, CD38+, CD138+) avec un CD56- et CD45- , présentant donc une population plasmocytaire normale (sujet sain) (figure 22,23).

3.3.8.2.3.1.2 Le témoin positif :

Les résultats de l'analyse du témoin positif contrairement au témoin négatif, montrent la coexistence de PC normaux et néoplasiques dans le même échantillon de moelle osseuse, car les deux populations plasmocytaires présentent des caractéristiques phénotypiques distinctes. Ceci est confirmé par l'analyse de la population qui s'écarte des cellules normales selon l'expression des AC aberrants. Les figures 24 ,25 montrent que la population en jaune représentant les PC néoplasiques a clairement perdu son expression en CD19 et CD27 comparativement avec la population plasmocytaire normale en bleu. Le CD56 est fortement exprimé sur la population jaune et totalement absent sur la population bleue. Le positionnement superposé des deux populations, bleu et jaune, selon leurs doubles expressions en CD38 et CD138 avec une surexpression de la population plasmocytaire normale, constitue le quatrième critère pour la distinction des cellules plasmatiques néoplasiques de leurs homologues normaux. L'analyse cytométrique a permis aussi de donner le taux des deux populations plasmocytaires existantes dans l'échantillon.

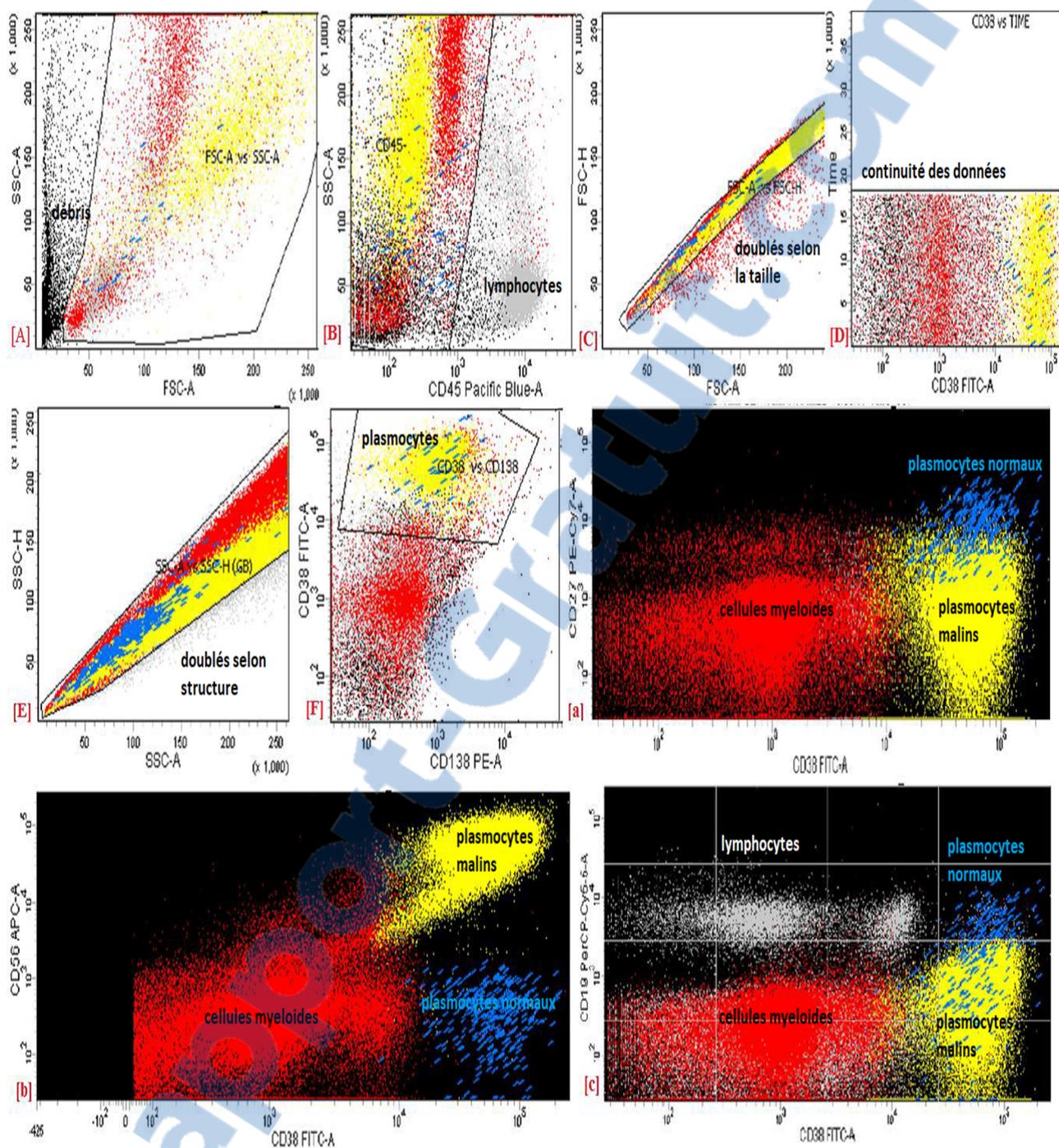
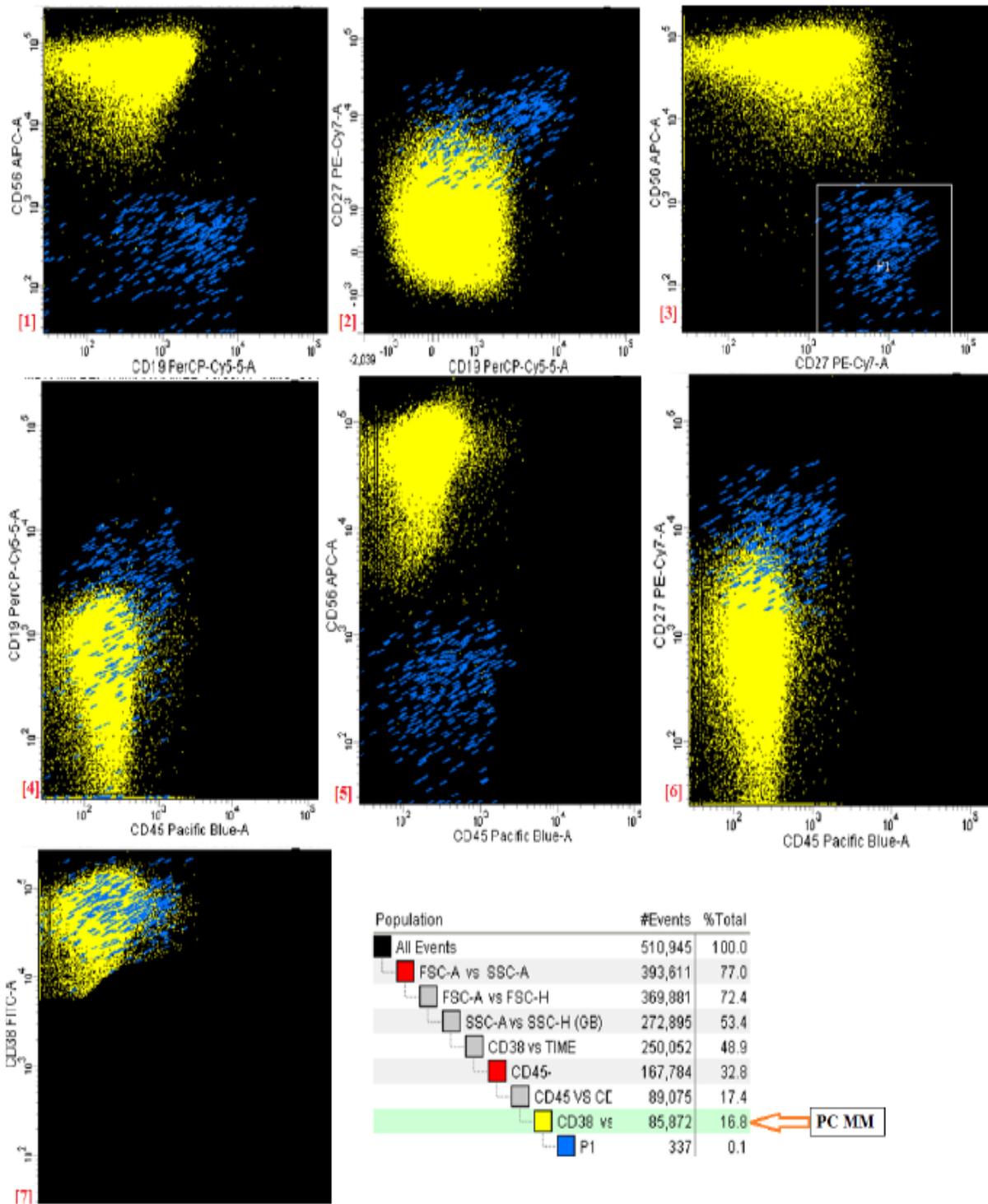


Figure 17 : Stratégie d'analyse d'un témoin positif en MM pour identifier toutes les PC. © Les PC néoplasiques (jaune) et les PC normaux (bleu). La population myéloïde (rouge) et les lymphocytes (population grise)



Les PC néoplasiques (jaune) et les PC normaux (bleu).

Figure 18: Présentation d'une analyse immunophénotypique d'un témoin positif. ©

3.3.8.3.2 Le SPIKE

Le Spike permet de définir la sensibilité et valider la spécificité du protocole. Il a également comme objectif de quantifier la limite de détection et de quantification. Sa réalisation nécessite un témoin négatif (prélèvement d'un sujet sain) et un témoin positif (patient atteint d'un myélome multiple).

3.3.8.3.2.1 Les protocoles étudiés

La mise en place de la technique d'évaluation de la MRD a porté sur l'étude de trois types de protocoles, étudiés de façon chronologique. L'amélioration de la technique d'évaluation de la MRD par CMF a été réalisée en augmentant le nombre de couleurs utilisées et en affinant la spécificité des marqueurs utilisés.

3.3.8.3.2.2 Le protocole adopté pour l'évaluation de la MRD

Ce protocole a été réalisé sur un cytomètre à 8 couleurs avec un seul tube et 6 anticorps. Les résultats du témoin négatif ont montré la coexistence, d'une part, d'une population positive en CD38 et CD138, avec une surexpression du CD19 et du CD27, ainsi qu'une expression totalement diminuée du CD56, et qui représente la population cellulaire normale. D'autre part, les résultats ont également mis en évidence un très faible signal d'une population positive en CD38 et CD138, mais avec une surexpression du CD56 et une diminution d'expression de CD19 et CD27. Cette dernière est celle d'un phénotype malin. Elle a été estimée par le cytomètre à 20 événements. Etant donné que l'échantillon étudié était un prélèvement de sang total chez un sujet sain, cette valeur a été considérée comme non significative. Par conséquent les 20 événements détectés ont été considérés dans notre protocole comme un bruit de fond et c'est au-delà de cette valeur que le marquage a été considéré comme positif.

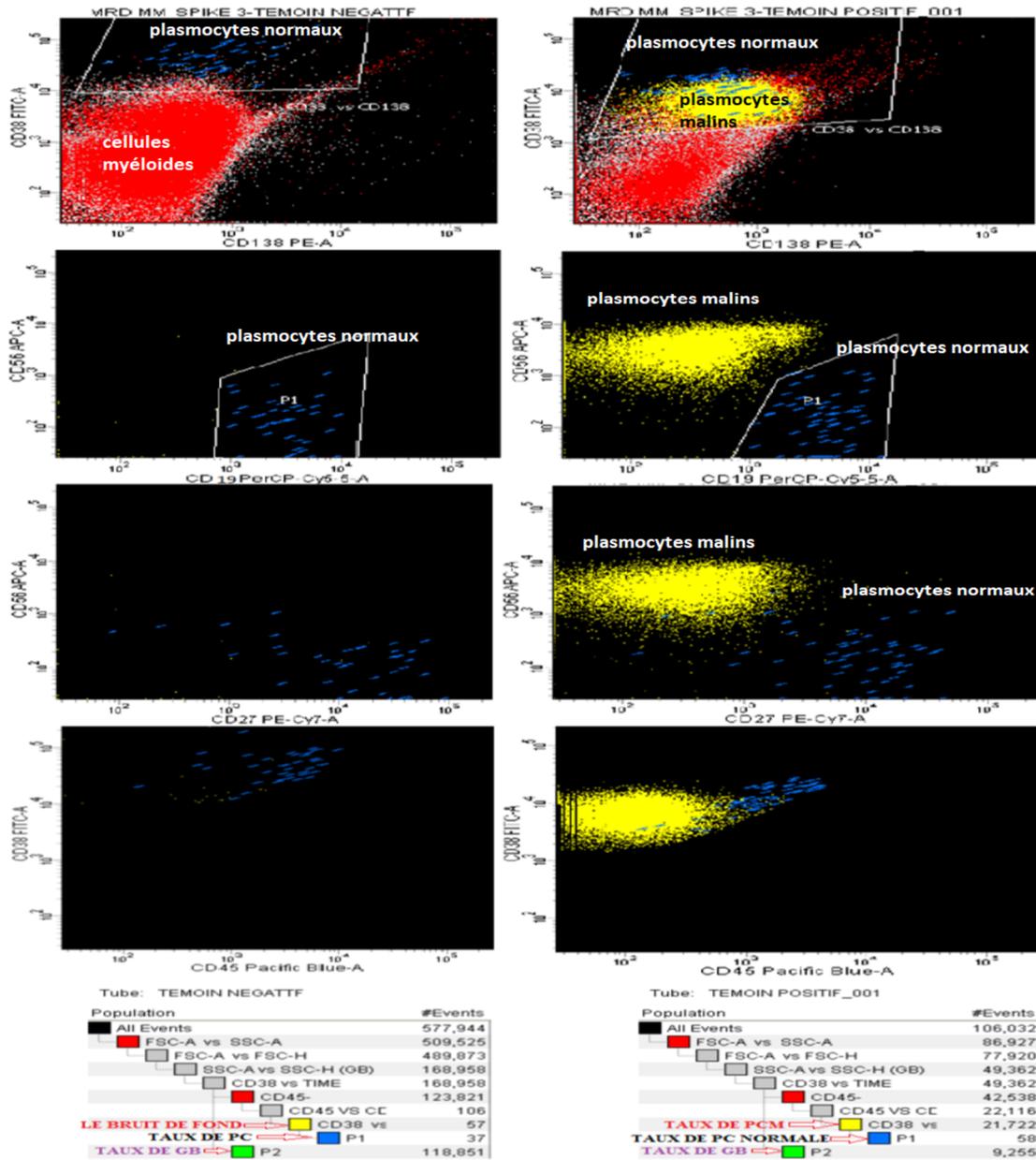


Figure 19 : Présentation comparative entre témoin positif et témoin négatif résultat d'un SPIKE. ©

La figure 19 représente une étude comparative entre le témoin positif et le témoin négatif. La population plasmocytaire normale, en bleu, est clairement identifiée sur les deux témoins. Elle est caractérisée par une expression positive en CD38, CD138, CD19, CD27, ainsi qu'une expression négative en CD56 et CD45. Tandis que la population plasmocytaire (CD38+) anormale, en jaune, présente une surexpression du CD56 et une expression négative du CD19, CD27 et CD45. Elle exprime un signal beaucoup plus fort que le témoin positif. Nous remarquons aussi une distinction franche entre les PC normaux et les PC malins sur le témoin positif.

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé la limite de détection et la limite de quantification. Ceci avait pour but d'évaluer le seuil de sensibilité défini comme le plus petit nombre d'évènement mesuré de manière fiable. Le Spike a été réalisé en effectuant une série de dilutions sur un témoin négatif et en les additionnant à des quantités connues et fixes de prélèvement d'un témoin positif (5ul de moelle d'un myélome nouvellement diagnostiqué). Nous avons ainsi, réalisé les dilutions suivantes au 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700, 1/800 et au 1/900 sur un prélèvement de sang total d'un sujet sain.

Parallèlement onze tubes BD Falcon avec le panel des six anticorps ont été préparés (tableau 15)

Fluorochrome	FITC	PE	PERCP	PE CYS7	APC	VIOLET
Anticorps	CD38	CD138	CD19	CD27	CD56	CD45
Volume utilisé par réaction en µl	10	10	10	5	5	5

Tableau 15 : Panels des 6 anticorps monoclonaux utilisés

Les deux premiers tubes étaient destinés pour un marquage des témoins positifs et négatifs, chacun dans un tube sans dilution. Tandis que les neuf tubes restants étaient destinés aux dilutions préparées pour le Spike. L'acquisition au cytomètre a été réalisée avec un minimum de 500.000 événements. Une population anormale a été considérée comme significative, si elle était homogène avec au moins 20 événements présentant le même profil antigénique aberrant pour les plasmocytes malins. Le tableau 14 illustre les résultats des différentes dilutions. La limite inférieure de quantification est de 0.069%. Elle correspond à la plus faible valeur détectée au-dessus de 50 évènements.

DILUTION	TAUX DE GB	TAUX DE PC NORMALE	TAUX DE PC DE MYELOME	% MRD
0.0100	92727	73	12886	13.896
0.0050	108862	53	7332	6.735
0.0033	162334	69	6177	3.860
0.0025	169697	75	6552	2.657
0.0020	287899	108	7650	1.717
0.0017	255755	51	4393	1.993
0.0014	282729	111	5637	0.202
0.0013	117982	194	239	0.202
0.0011	97010	147	67	0.069
0.0000	118851	37	20	0.016

Tableau 16 : Résultats du SPIKE obtenus par CMF.

La courbe de dilution est présentée sur la figure ci-dessous. Elle montre la distribution des pourcentages des PCM en fonction des dilutions et objective une linéarité avec un coefficient de corrélation à $R^2=0.96$.

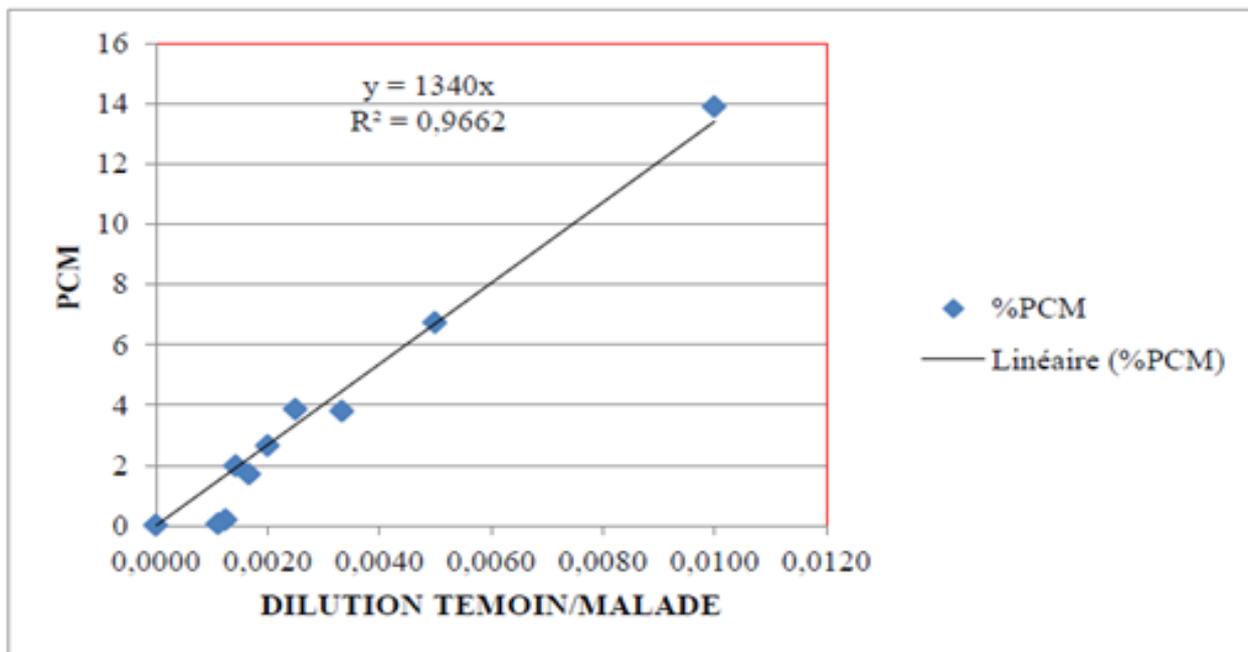


Figure 20 : Courbe du Spike

La numération des globules blancs par cytométrie a permis de calculer les pourcentages des PCM enregistrés . Les valeurs de la MRD ont été obtenues en pourcentage, en divisant le nombre d'évènements de cette population pathologique significative par le nombre d'évènements des globules blancs analysés par le cytomètre.

La limite inférieure de détection a été définie dans notre panel comme le plus faible pourcentage de PCM, juste au-dessus de la limite de détection estimée à 20 évènements. Nous avons réalisé le test de SPIKE plusieurs fois pour la déterminer. La limite inférieure de détection a été calculée à 0.01%, soit un seuil de 10^{-4} (tableau 17).

Dilution	0	0.003	0.005	0.01	0.02	0.025	0.05	0.1	1
%MRD	0.010	0.011	0.015	0.036	0.0134	0.218	0.419	0.820	13.77

Tableau 17 : Les résultats du SPIKE déterminant la limite inférieure de détection

3.3.9 Méthodes d'évaluation de la MRD

Trois protocoles ont été élaborés et testés avant de valider celui avec lequel l'étude de la MRD a été menée (troisième protocole).

3.3.9.1 Première méthode d'analyse (1^{er} protocole)

Dans un premier temps nous avons utilisé une technique nécessitant 7 tubes, avec un cytomètre à 4 couleurs avec le panel des anticorps suivants CD19,CD20,CD27,CD28,CD45,CD56,CD117, CD138,CD38. Un mélange de trois marqueurs de repérage est préparé comme suit, anti-CD38 APC [10µL] + anti-CD45 FITC [25µL] + anti-CD138 PerCP-Cy5.5 [50µL]. Au prélèvement médullaire, ajustée à 5×10^5 cellules par tube, sont ajoutés 8,5µl du mélange suivant, anti-CD38 APC/anti-CD138 PerCP-Cy5.5/anti-CD45 FITC. Un quatrième anticorps monoclonal (IgG1 PE ou anti-CD19 PE ou anti-CD56 PE ou anti-CD28 PE ou anti-CD27 PE ou anti-CD20 PE ou anti-CD117 PE) est ajouté par la suite dans chaque tube (tableau 18).

APC, allophycocyanine ; FITC, isothiocyanate de fluoresceïne ; PE, phycoerythrine ; PerCP-Cy5.5, peridin chlorophyll-cyanine5.5.

Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6	Tube 7
suspension cellulaire [5×10^5 cellules]						
mélange anti-CD38 APC/anti-CD138 PerCP-Cy5.5/anti-CD45 FITC [8,5 µL]						
IgG1 PE [3,5 µL]	anti-CD19 PE [5 µL]	anti-CD56 PE [5 µL]	anti-CD28 PE [10 µL]	anti-CD27 PE [10 µL]	anti-CD20 PE [10 µL]	anti-CD117 PE [10 µL]

Tableau 18: Panel utilisé lors du premier protocole expérimental (3 patients ont été concernés par cette analyse avant qu'elle ne soit améliorée).

3.3.9.2 Deuxième méthode d'analyse (2^{ème} protocole)

Dans un deuxième temps, après l'installation d'un cytomètre à 8 couleurs, permettant l'utilisation de 3 tubes au lieu de 7, l'étude a été poursuivie. 30 patients ont été inclus et ont fait l'objet d'une analyse cytométrique à la recherche de la MRD en utilisant le même panel que précédemment.

Les cellules ont été incubées pendant 15 minutes avec du CD45 APC-H7, CD38-FITC, CD138-PE du CD3, soit en PerCP ou en PC7 et CD8, du CD19-PerCP, CD56-APC, , CD20-PC7 ou du CD27-PC7, CD 117-APC ou du CD28-PC7 et CD 117-APC .

	FITC	PE	Per CP	PC7	APC	APC-H7
Tube1	CD38	CD138	CD3	CD3	CD8	CD45
Tube2	CD38	CD138	CD19	CD20	CD56	CD45
Tube3	CD38	CD138	***	CD27	CD117	CD45
Tube4	CD38	CD138	***	CD28	CD117	CD45

Tableau 19 Panel utilisé lors du deuxième protocole expérimental

3.3.9.3 Troisième méthode d'analyse (3^{ème} protocole)

Après une analyse de la bibliographie portant sur l'évaluation de la MRD et les panels utilisés [35,36] nous avons amélioré et validé une troisième technique après une confrontations de nos premiers résultats des deux protocoles précédents. Dans cette dernière analyse, nous avons utilisé une combinaison de six anticorps à fluorochromes différents, titrés (BD Biosciences) dans un seul tube (Tableau 15). Pour cette dernière méthode d'analyse de la MRD, nous avons inclus 50 patients.

Fluorochrome	FITC	PE	PERCP	PE CYS7	APC	VIOLET
Anticorps	CD38	CD138	CD19	CD27	CD56	CD45
Volume utilisé par réaction en µl	10	10	10	5	5	5

Tableau 15 : Panels d'anticorps monoclonaux utilisés lors du troisième protocole

3.3.9.3.1 Procédure d'immunomarquage de la troisième méthode

Les échantillons de moelle osseuse prélevés sur tube EDTA ont été contrôlés par une FNS pour évaluer le taux de globules blancs. Selon ce taux, une dilution a été réalisée avec une solution salée tamponnée au phosphate (PBS), pour ajuster à 10.000 le taux de globules blancs avant d'entamer la procédure de marquage. Pour un immunomarquage multi-couleur direct, un volume total de 100 µl d'échantillon frais ajusté après une dilution, a été marqué avec des anticorps monoclonaux titrés (BD Biosciences), incubés puis lysés avec la solution de lyse (FACS lysing solution®, BD Biosciences) et lavés, conformément aux recommandations des fournisseurs. Le panel d'anticorps (AC) utilisé pour une analyse en un seul tube (tableau 14) a inclus les AC anti-CD38 en FITC, anti-CD138 en PE, anti-CD19 en PERCP, anti-CD27 en PE CYS7, anti-CD56 en APC et anti-CD45 en violet. La manipulation a été effectuée selon les étapes suivantes : Une étape de préparation d'un tube Falcon (BD Falcon), de 5 ml, spécial pour l'acquisition au cytomètre. La deuxième étape, consiste en l'ajout des anticorps indiqués dans le tableau 15 selon les doses figurées. A noter que le CD 45 a été dilué au tiers avec du PBS. La troisième étape, a consisté en l'ajout de 100µl de moelle osseuse diluée dans le tube Falcon et mélangée à l'aide d'un vortex. La quatrième étape, porte sur l'incubation de la préparation pendant 15 minutes à

température ambiante et à l'abri de la lumière. L'étape suivante, une fois incubée, 2 ml d'une solution de lyse diluée au dixième (1/10) en eau distillée a été ajoutée au tube et a été immédiatement vortexé et incubé pendant 10 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante. Enfin, la dernière étape, porte sur une centrifugation pendant 5 minutes à 1500 tours/mn pour un lavage suivie de l'élimination du surnagent par versement. Les cellules ont été remises en suspension en ajoutant 500 ul de PBS. Au terme de cette manipulation, le prélèvement est prêt à l'acquisition au niveau du cytomètre. Les informations cytométriques ont été traitées et analysées par le logiciel BDFACS Diva.

3.3.9.3.2 L'évaluation de la MRD

L'évaluation de la MRD a été réalisée en trois étapes. La première étape, appelée backbone, a consisté en l'analyse des cellules selon leur expression en CD45, CD38 et CD138. Cette étape est essentielle pour identifier la véritable région incluant la totalité des plasmocytes médullaires. La deuxième étape a porté sur la vérification de la région sélectionnée par rapport au témoin interne du panel. La dernière étape a consisté en la vérification des marqueurs aberrants, le CD56, le CD19 et le CD27.

3.3.9.3.2.1 Etape de backbone :

Cette étape permet de maximiser l'inclusion de PC normaux et néoplasiques tout en permettant l'élimination des événements contaminants non plasmocytaires.

(Figure 21).

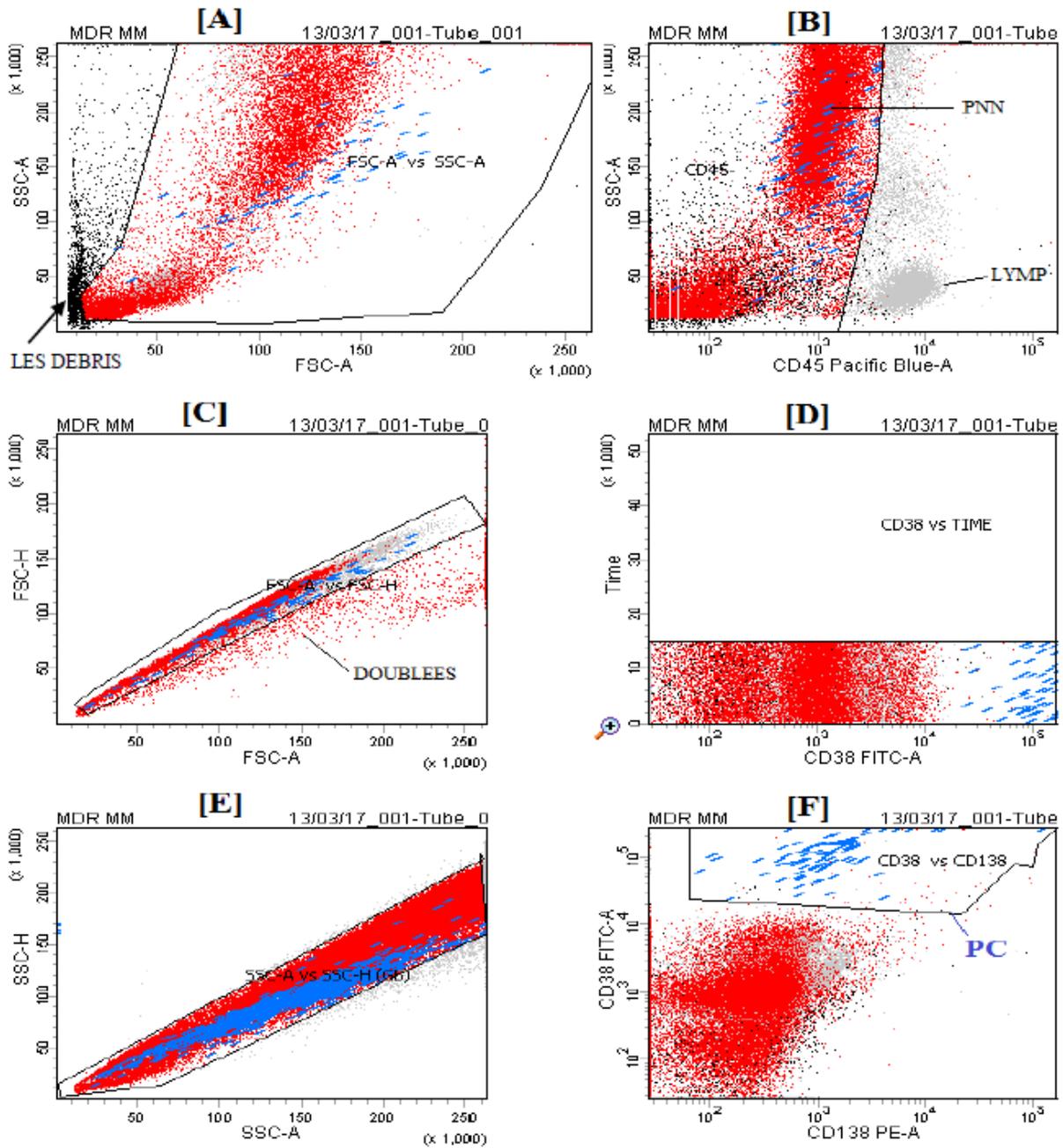


Figure 21: Stratégie d'analyse visant à sélectionner et identifier les cellules plasmocytaires par rapport à un ensemble hétérogène ©

3.3.9.3.2 Les témoins internes

Les cellules de phénotype B sont utilisées comme témoin positifs pour le CD19, le CD45, le CD38, et le CD27, tandis que les cellules de phénotype myéloïde, sont utilisées comme des témoins négatifs pour le CD56, le CD19, le CD27 et le CD38 (figure 22). Cette étape consiste à vérifier l'emplacement de la population plasmocytaire par rapport aux autres populations cellulaires selon leur expression à l'AC utilisé.

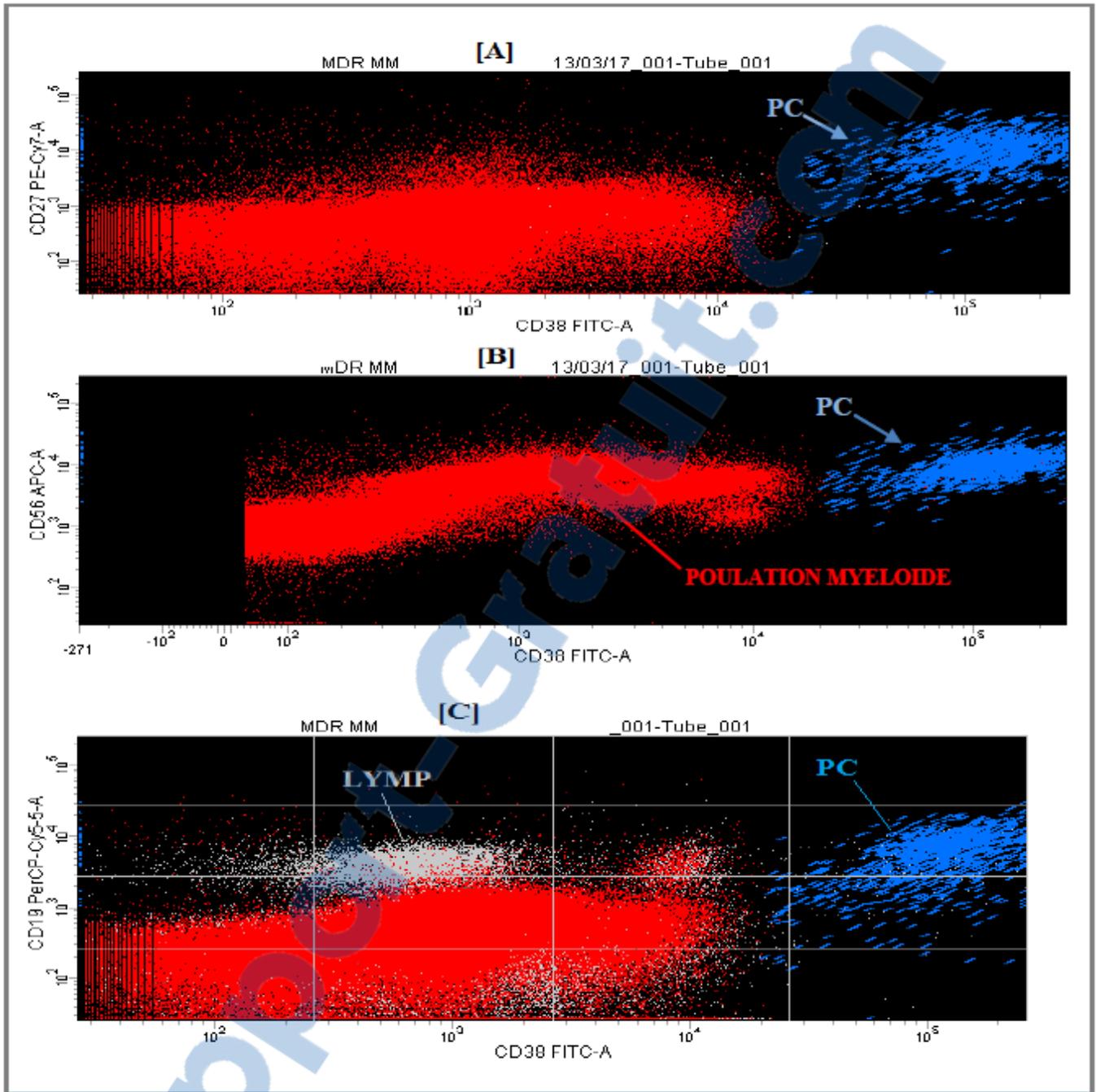


Figure 22 : Stratégie d'analyse étape de vérification par le témoin interne d'échantillon.

Au cours de cette étape, nous devons comparer le niveau d'expression de la population plasmocytaire caractérisée par une forte expression en CD38, aux autres populations en fonction des AC utilisés. A titre d'exemple la comparaison du niveau d'expression des plasmocytes en CD19 avec celui des lymphocytes, montre qu'ils ont le même niveau de positivité (Figure 29[C]). En effet, la population plasmocytaire normale a le même niveau d'expression que les lymphocytes en CD19.

3.3.9.3.2.3 Interprétation

Cette étape est une procédure d'analyse. Elle consiste à étudier l'expression phénotypique de la région plasmocytaire (CD38+/CD138+) selon des histogrammes bi paramétriques. La distinction entre les plasmocytes normaux (CD56- ; CD19+ ; CD27+) et les plasmocytes tumoraux est basée sur l'expression des phénotypes aberrants (CD56+ ; CD19- ; CD27-) existants au niveau des plasmocytes malins. La MRD est évaluée ainsi, selon les critères suivants, d'une part, l'existence d'une population plasmocytaire positive en CD56, la négativité du CD19 et du CD27 et d'autre part, avec un nombre d'évènements supérieur à 20.

3.3.9.3.3 L'évaluation des résultats

Les résultats post thérapeutiques ont été évalués en termes de survie par la méthode de Kaplan et Meier, et la comparaison des courbes de survie, a été réalisée par la méthode du Log Rank test, à l'aide du Logiciel SPSS version 20 et par le test de Fisher. La date de point de l'étude a été fixée au 1^{er} Décembre 2017.

4 RESULTATS

4.1 Etude descriptive des patients

De février 2015 à juillet 2017, 97 patients âgés de moins de 65 ans ont été inclus dans notre étude. 45 patients ont été exclus car non éligibles à une intensification suivie d'autogreffe de CSH, en raison de leurs comorbidités (insuffisance cardiaque grave, insuffisance hépatocellulaire,...).

4.1.1. Données anthropologiques

Les données anthropologiques sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Caractéristiques	Patients %(n)
sex ratio H/F	1,4
Masculin	58(56)
féminin	42(41)
Age	
médiane (min-max.)	58 (35-65)
< 50 ans	32(31)
≥ 50 ans	68(66)

Tableau 20 : Données anthropologiques de la population étudiée.

4.1.2 Etude clinique

Les douleurs osseuses étaient au premier plan des manifestations cliniques.

Signes cliniques	Pourcentage de patients (%)
Douleur	96
Pâleur	28

Tableau 21 : Clinique

4.1.3 Etude biologique

4.1.3.1 Hémogramme

Les données de l'hémogramme sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 22).

Hémoglobine	10 (6 - 14)
Globules blancs	6000/mm ³ (3000-14000)
PNN	3600/mm ³ (1530-12000)
Lymphocytes	2050/mm ³ (800-3300)
Plaquettes	234.000/mm ³ (30.000-733.000)

Tableau 22 : Hémogramme

4.1.3.2 Protidogramme

Les données concernant la mise en évidence, la nature et la quantification de la protéine M dans le sérum et/ou les urines pour l'ensemble des patients de l'étude sont reportées dans le tableau 23.

Caractéristiques	Pourcentage patients (%)
Protidémie (taux médian)	100 (56 - 148) g/l
>80 g/l	79
>100 g/l	48
IF positive	91
Type de protéine M	
IgG	63
IgA	22
chaînes légères	15
Type de chaîne légère	
κ	69
λ	31

Tableau 23: Protidogramme

4.1.3.3 Etude cytologique

Les résultats du médullogramme, notamment ceux de la plasmocytose médullaire ont objectivés un taux médian de plasmocytes à 27% avec des extrêmes variant entre 10% et 90 %.

4.1.3.4 Bilan radiologique

Les lésions osseuses sont représentées dans le tableau ci-dessous

Signes radiologiques	Pourcentage(%)
Lésions ostéolytiques	86
Tassement vertébral	28
Fracture pathologique	12
Masse plasmocytaire	12
Déminéralisation osseuse	12
Compression médullaire	8

Tableau 24 : Signes radiologiques

4.1.3.5 Autres paramètres biologiques

L'hypercalcémie a été recherchée pour juguler ses complications. L'atteinte rénale particulièrement fréquente au cours de cette affection, l'albuminémie ainsi que le dosage de la β 2 microglobuline ont également été évalués.

Paramètres	Taux médian	pourcentage
Calcémie > 110 mg/l	92(69-127) mg/l	17
Créatininémie > 20,0 mg/l	10(5,9-72) mg/l	12
Albuminémie < 35 g/L	37 (24-48) g/L	41
β2 microglobuline > 3,50		57

Tableau 25: Autres paramètres biologiques.

4.1.4 Classifications

La répartition des patients selon la classification de Durie et Salmon et selon l'ISS est détaillée dans le tableau ci-après (tableau 26).

Classification / Stade	Pourcentage de patients (%)
Classification de Durie et Salmon	
II A	1
III	99
A	90
B	10
Classification ISS	
I	31
II	45
III	24

Tableau 26 : Classification de Durie et Salmon et ISS

4.1.5 Protocoles de chimiothérapie d'induction

Les patients ont été traités selon les protocoles de chimiothérapie suivants :

Protocole	Pourcentage de patients (%)
PAD	1
VAD	8
VCD	22
VD	11
MP	1
VTD	57

Tableau 27: Protocoles de chimiothérapie d'induction

4.1.6 Résultats thérapeutiques après chimiothérapie d'induction

Le taux de réponse globale est de 88% avec 40% de RC et 48% de très bonne réponse partielle (tableau 28).

Evaluation après chimiothérapie induction	Patients (n) %
Réponse partielle (RP)	(11), 12
Très bonne réponse partielle (TBRP)	(47), 48
Réponse complète (RC)	(39), 40
Total	(97), 100

Tableau 28 : Résultats thérapeutiques après chimiothérapie d'induction

4.1.7 Résultats de l'intensification

Tous les patients ayant obtenus une réponse post induction (RC, TBRP ou RP) ont bénéficié d'une intensification suivie d'une autogreffe de CSH. Après mobilisation par le G-CSF seul (15 µg/kg/j), tous les patients ont eu un recueil de CSH >2x10⁶/kg avec une médiane de 3,38x10⁶/kg (2-13,2). Au terme d'une conservation du greffon d'une durée de 24heures, à +4°C, la médiane de viabilité des CD34⁺ perfusées est de 98% (97,4-100). La prise de greffe des CSH est attestée sur la remontée du taux des PNN mesurée en jours, et dont la médiane est de 10 jours (7-14), et celle du taux de plaquettes (en jours) et dont la médiane est de 13 jours (9-19). Aucun échec de prise de greffe n'a été noté et également aucun décès n'a été relevé en termes de TRM (Transplant Related Mortality). Au cours de la phase d'aplasie, 68% des patients ont présenté une mucite de grade 3-4 et aucun patient n'a nécessité un transfert vers la réanimation médicale pour un choc septique ou un désordre métabolique grave. Après leur sortie de l'unité d'autogreffe, tous les patients ont été revus à J100 post autogreffe.

4.1.8 Résultats thérapeutiques après intensification et autogreffe

Au terme des J100, tous les patients ont été revus pour une évaluation, d'une part avec les moyens conventionnels et d'autre part, avec une analyse par CMF de la MRD.

4.1.8.1 Evaluation de la réponse avec les moyens conventionnels à J100

Les résultats de la réponse post autogreffe sont reportés au niveau du tableau 29.

Résultats thérapeutiques	Patients (n), %
Réponse complète	(78) 80
TBRP	(19)20
Réponse globale	(97) 100

Tableau 29 : Résultats thérapeutiques post autogreffe de CSH

La comparaison des résultats thérapeutiques avant et post autogreffe montre une amélioration du taux de RC qui passe de 40% à 80% et 12% de réponse partielle transformée en TBRP ou en RC.

Type de réponse	AVANT AG	POST AG	<i>p-value</i>
RC	(39), 40	(78) 80	
TBRP	(47), 48	(19) 20	
RP	(11), 12		

Tableau 30 : Résultats thérapeutiques avant et post autogreffe de CSH

4.1.8.2 Résultats de l'évaluation de la réponse post-autogreffe par MRD (CMF)

L'introduction de la mesure de la MRD par cytométrie en flux a nécessité d'une part la validation de la technique et d'autre l'exploitation de ses résultats par rapport aux moyens d'évaluation conventionnels. Notre travail a débuté de façon prospective en février 2015 et s'est achevé en juillet 2017. Tous les patients en RC ont bénéficié d'une analyse de leur réponse par la recherche de la MRD.

4.1.8.2.1 Validation de la technique d'évaluation de la MRD par la CMF

Trois techniques de quantification de la MRD ont été utilisées. La première méthode, basée sur un système à 4 couleurs et sept tubes, a donné les résultats suivants. Après une analyse réalisée chez 3 patients, la technique a vite été abandonnée en raison du manque de sensibilité des anticorps CD38 et CD138 utilisés et des difficultés d'interprétation des résultats obtenus. En effet l'analyse individuelle des marqueurs a prêté à discussion. Ainsi à titre d'exemple, devant la positivité d'un marqueur tel que le CD56 qui n'est retrouvé que dans 60% des MM, il nous a été difficile de conclure à la positivité ou la négativité de la MRD sur le résultat isolé de ce marqueur et de fournir une interprétation rigoureuse. Par ailleurs tous les résultats internationaux publiés à ce jour sont basés sur un immunophénotypage en CMF entre 6 et 8 couleurs.

La deuxième méthode, a porté sur un système à 8 couleurs, comportant selon les recommandations internationales, l'utilisation du même panel d'anticorps mais sur trois tubes. Dans cette étude, 30 patients ont été inclus. Après analyse des résultats, nous avons constaté que certains marqueurs n'étaient pas spécifiques et donc non indispensables pour la détection de la maladie résiduelle. Il s'agit des marqueurs CD20, CD28 et CD117. En effet, devant le pourcentage élevé, de faux positifs et de faux négatifs et de certains résultats se situant à la limite de la positivité et de la négativité, il nous a été difficile de conclure de façon objective (tableau31). Néanmoins, nous avons de façon formelle, relevé avec cette méthode, 14 patients présentant une MRD positive, 14 patients présentant une MRD négative et chez 2 patients, le prélèvement a été irrégulier.

Marqueurs	FAUX NEGATIFS		FAUX POSITIFS	
	N	%	N	%
CD117	7/14	50	10/16	62,5
CD56	2/14	14	0/16	0
CD28	9/14	64	12/16	75
CD27	2/14	14	0/16	0
CD20	7/14	50	12/16	75
CD19	1/14	7	3/16	19

Tableau 31 : Résultats obtenus chez 30 patients avec le deuxième protocole expérimental

La troisième méthode a porté sur un système d'exploitation à 8 couleurs mais avec un panel d'anticorps dépourvu des trois anticorps CD20, CD28 et CD117 précédents et a été réalisée sur un seul tube. Cette méthode a été améliorée et validée sur un panel d'anticorps plus restreint, plus sensible et plus spécifique. Avec cette méthode, la positivité de la MRD a été définie lorsqu'au minimum 20 PC néoplasiques ont été détectés. Le nombre d'événements acquis pour les tests de MRD est de 500.000 événements et le nombre de cellules plasmatiques anormales nécessaires pour quantifier le pourcentage de la MRD a été fixé à 50 événements de PC néoplasique. 50 patients ont été inclus au cours de cette méthode. 10 MRD positives ont été décelées dont 8 quantifiables

4.1.8.2.2 Résultats de l'évaluation de la MRD par la CMF

Au total, 24 MRD positives ont été détectées par les deux dernières méthodes, ce qui représente 30,77% de l'ensemble de la cohorte étudiée. Une MRD positive, chez deux patients, n'a pu être quantifiée, car étant en-dessous du seuil de quantification précisé par les recommandations de la technique. Le reste de l'ensemble prélèvements réguliers est caractérisé par une MRD négative à 10^{-4} .

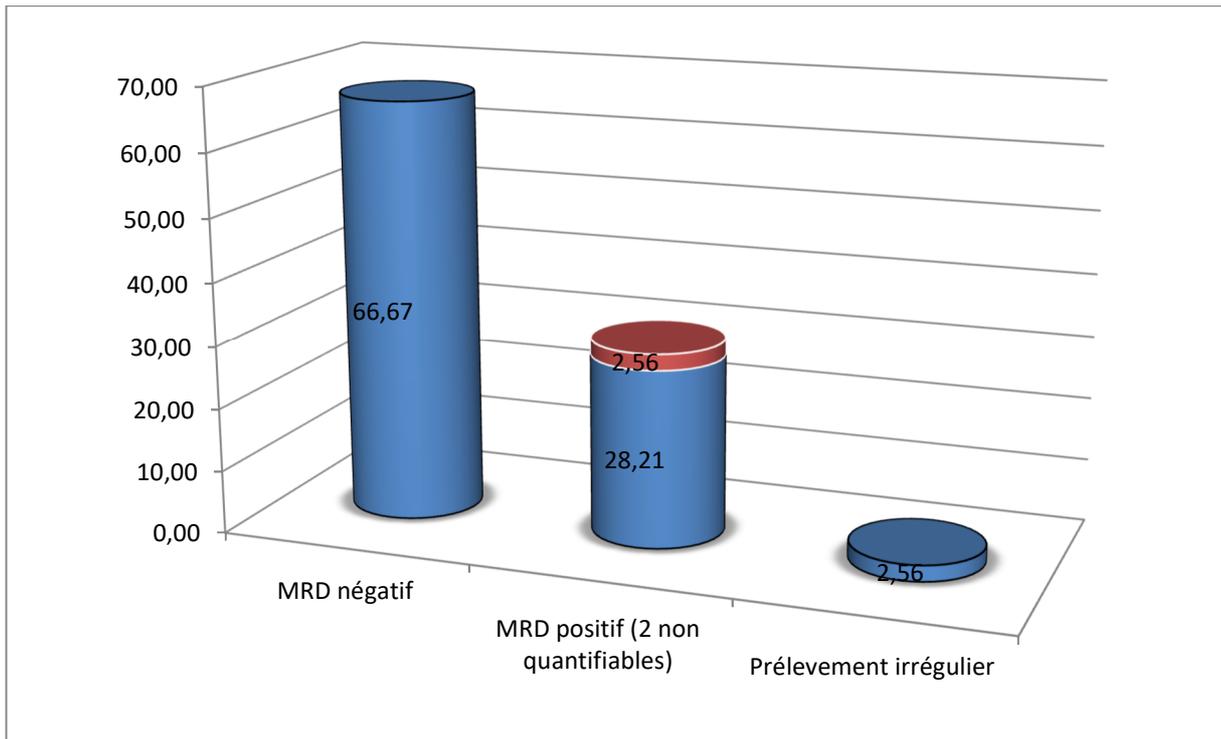


Figure 23 : Représentation graphique des pourcentages des patients selon les résultats obtenus pour la présence ou l'absence de la MRD.

4.1.9 Evaluation de la survie des patients

A la date de point du 31/12/décembre 2017 et avec un suivi médian de 37,5 mois, nous avons relevé deux décès. La courbe de survie globale montre un taux de survie globale de 96% à 106 mois (tableau 32) (Figure 24).

Moyennes et médianes du délai de survie

Moyenne ^a				Médiane			
Estimation	Erreur std.	Intervalle de confiance à 95 %		Estimation	Erreur std.	Intervalle de confiance à 95 %	
		Limite inférieure	Limite supérieure			Limite inférieure	Limite supérieure
103,208	1,952	99,383	107,034

a. L'estimation est limitée au délai de survie le plus long en cas de censure.

Tableau 32 Survie globale des patients atteints de MM EHU Oran (médiane non atteinte)

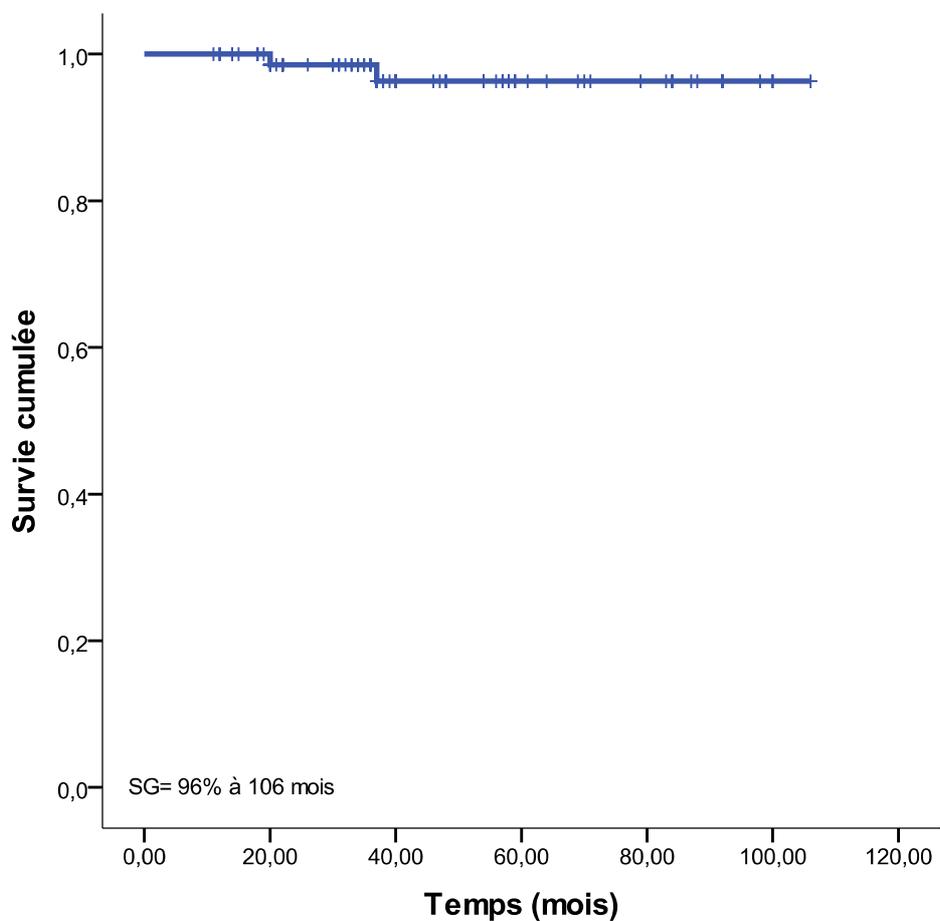


Figure 24 : survie globale des patients

La médiane de survie sans progression est de 90 mois (tableau33) (Figure 25)

Moyennes et médianes du délai de survie

Moyenne ^a				Médiane			
Estimation	Erreur std.	Intervalle de confiance à 95 %		Estimation	Erreur std.	Intervalle de confiance à 95 %	
		Limite inférieure	Limite supérieure			Limite inférieure	Limite supérieure
70,082	4,932	60,415	79,748	90,000	12,857	64,801	115,199

a. L'estimation est limitée au délai de survie le plus long en cas de censure.

Tableau33 : Survie sans rechute des patients MM EHU Oran

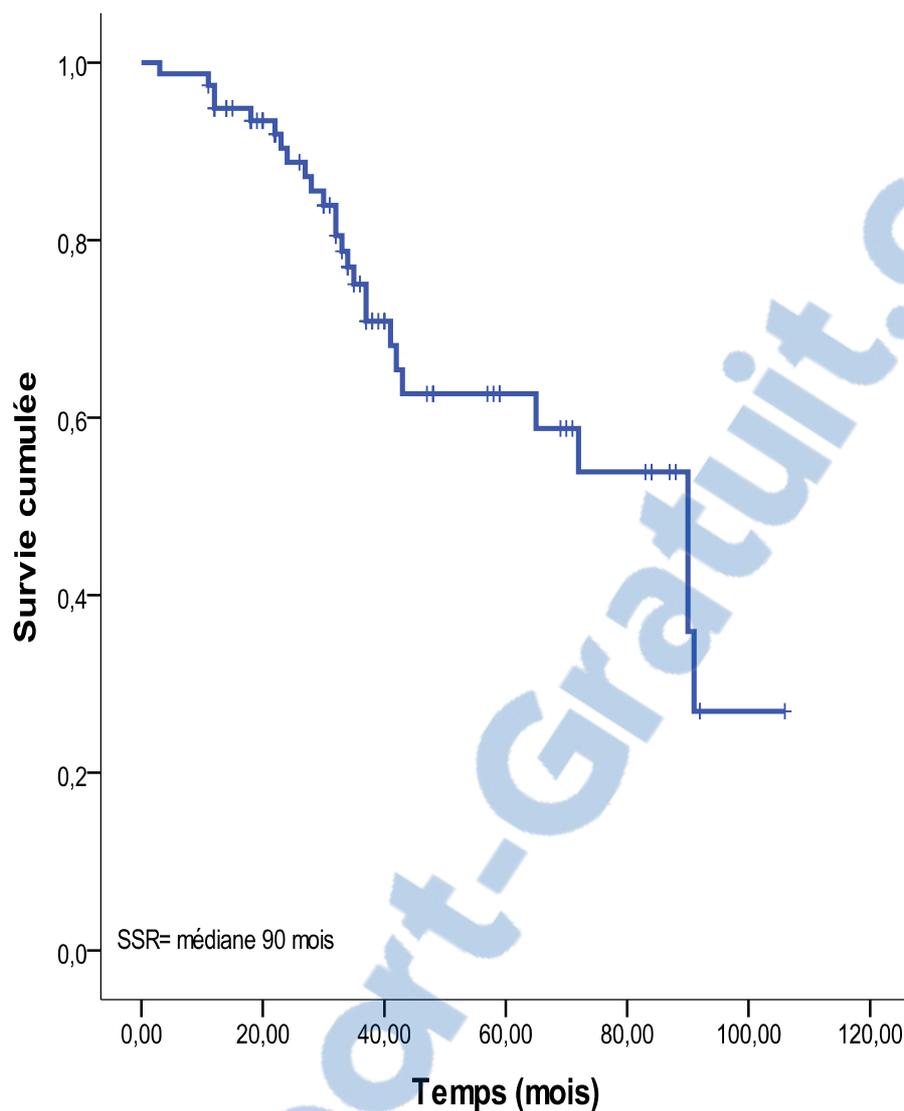


Figure 25 : survie sans rechute des patients avec MM EHU Oran

4.1.10 Evaluation de la survie selon les résultats de la MRD

Le tableau 34 montre l'absence d'atteinte des médianes au niveau des deux groupes de patients MRD+ et MRD-, mais en terme de moyenne celle des patients ayant une MRD-est de 103,4 et celle des MRD+ est de 96,6 mois. En raison du faible taux de décès (un dans chaque groupe de malades), les courbes de survie n'ont pu être établies par le système SPSS .

Selon la MRD positive ou négative, les survies sans rechute sont respectivement de 33 mois pour le groupe MRD+ et une médiane non atteinte pour le groupe MRD- avec une différence très significative (p=0,0001) (Tableau 34 et Figure 26).

Moyennes et médianes du délai de survie sans rechute

VAR0001 1	Moyenne ^a				Médiane			
	Estimation	Erreur std.	Intervalle de confiance à 95 %		Estimation	Erreur std.	Intervalle de confiance à 95 %	
			Limite inférieure	Limite supérieure			Limite inférieure	Limite supérieure
1,00	94,228	4,989	84,449	104,008
2,00	44,282	5,995	32,533	56,032	33,000	3,429	26,279	39,721
– Global	70,082	4,932	60,415	79,748	90,000	12,857	64,801	115,199

a. L'estimation est limitée au délai de survie le plus long en cas de censure.

Tableau 34 : Comparaison des survies sans rechute des patients ayant une MRD négative ou positive.

Comparaisons globales

	Khi-deux	ddl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	28,615	1	0,0001

Test d'égalité des distributions de survie pour les différents niveaux de VAR00011.

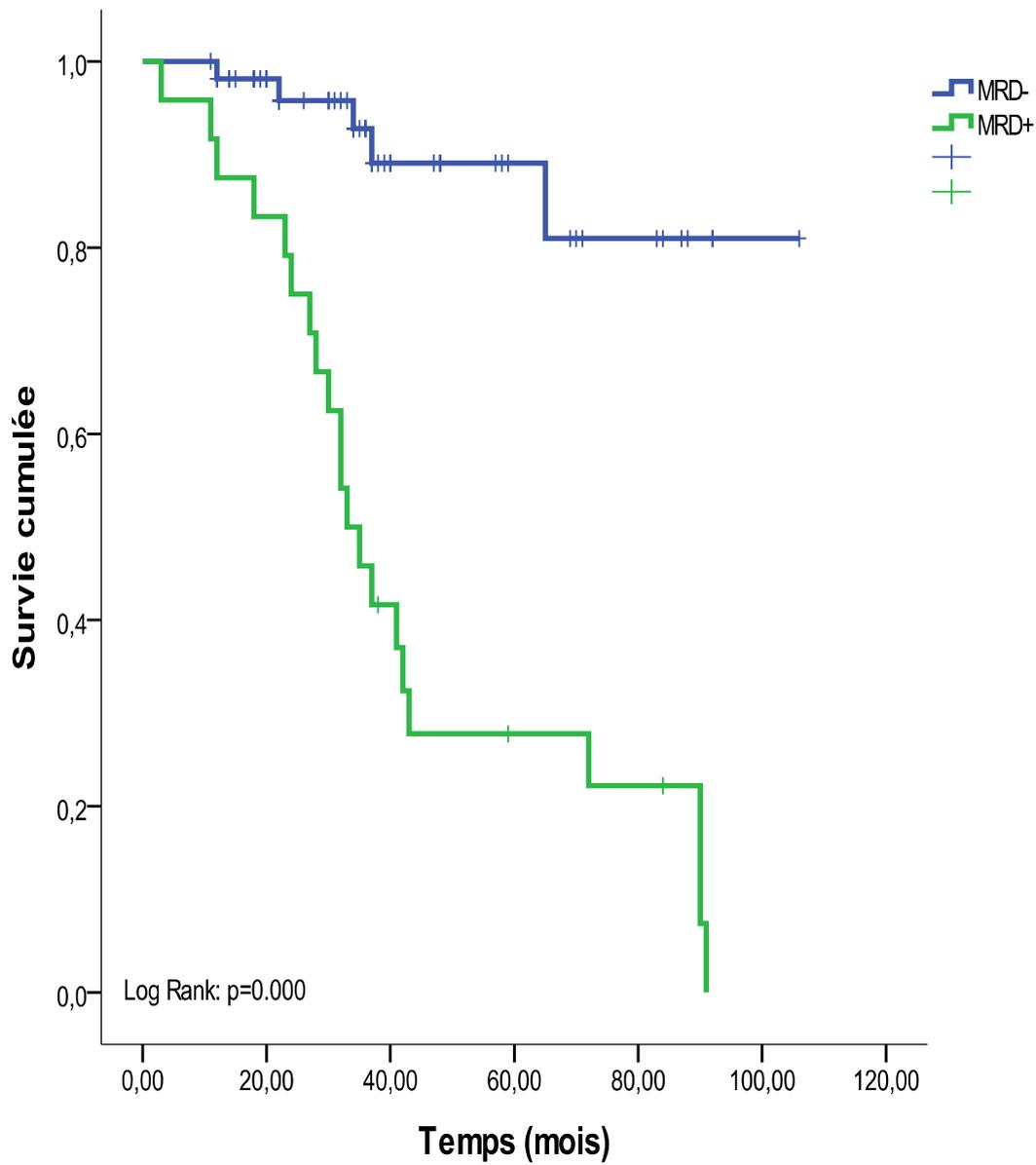


Figure 26 : survie sans rechute des patients atteints de MM avec une MRD négative ou positive

La probabilité cumulée de rechute selon le statut de la MRD positive ou négative est reportée au niveau de la figure 27 et montre qu'en cas de MRD+, 19 à 20% des patients rechutent de façon précoce aux alentours de 20 mois alors que pour le groupe MRD-, près de 10% des patients rechutent tardivement au-delà de trois ans (Figure 27).

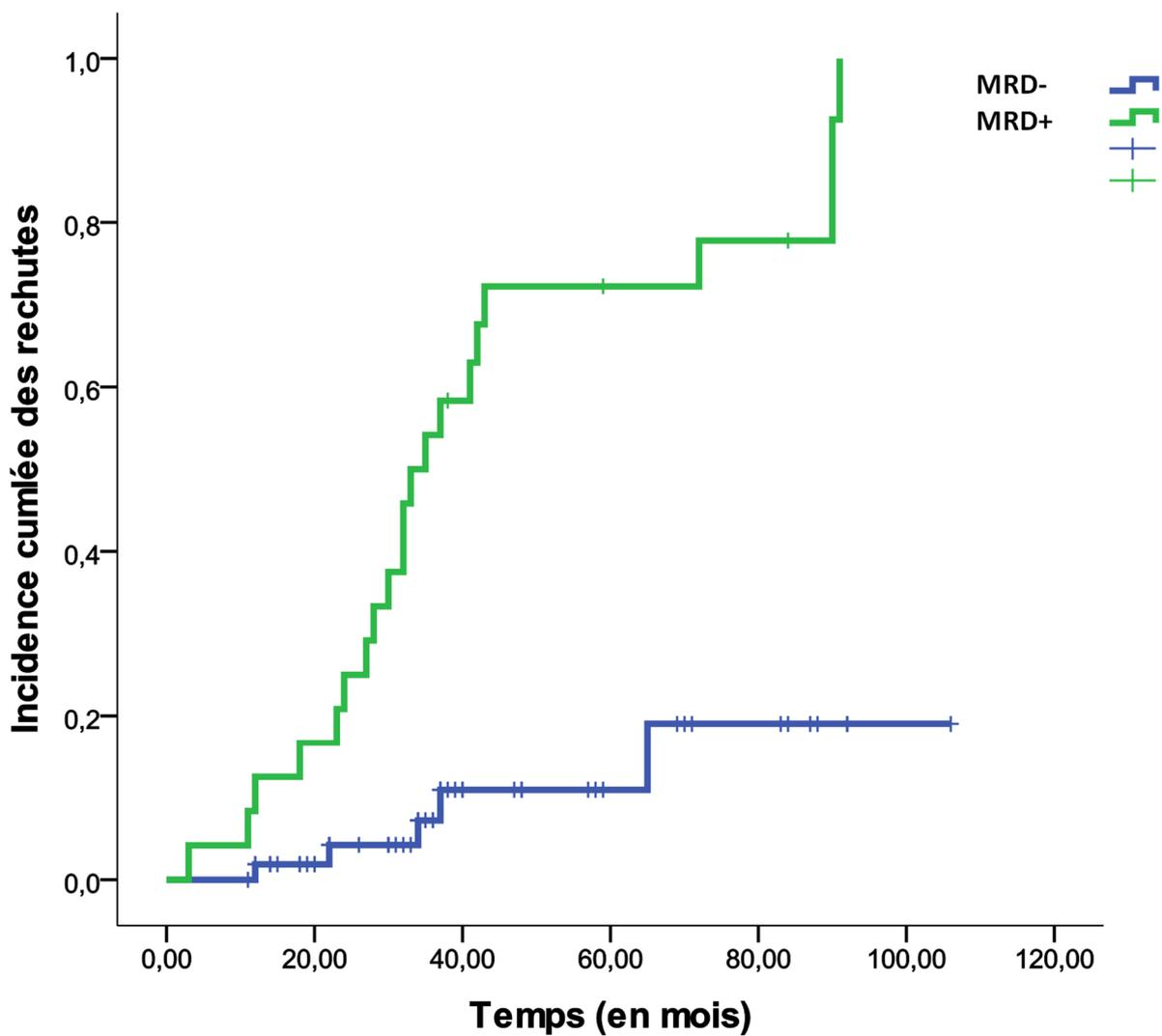


Figure 27 : Incidence cumulée des rechutes selon le statut MRD+ ou MRD-des patients atteints de MM

6. DISCUSSION

Ce travail porte sur une étude prospective, évaluant la réponse après un traitement d'induction par chimiothérapie et une intensification par une chimiothérapie à haute dose suivie de la perfusion de cellules souches hématopoïétiques autologues, chez des patients âgés de moins de 65 ans et présentant un MM symptomatique. La période d'étude s'étend de février 2015 à juillet 2017 et a concerné 97 patients dont 78 évaluables pour la recherche de la maladie résiduelle.

Du point de vue des données anthropologiques, notre étude a montré une prédominance masculine. La répartition homme/femme est donc similaire aux données de la littérature, où toutes les séries de patients atteints de MM publiées ces dix dernières années rapportent un sex ratio H/F supérieur à 1, en général proche de 1,5, comme retrouvé dans notre série [39, 40].

Les données obtenues concernant l'âge de notre série de patients, sont discordantes avec celles de la littérature. En effet, l'âge minimum est de 35 ans et l'âge maximal est de 65 ans avec une forte proportion (32%) de patients âgés de moins de 50 ans. La médiane d'âge au diagnostic est de 58 ans alors que dans la majorité des études publiées, elle se situe entre 60 et 65 ans [84].

Du point de vue clinique, la principale manifestation retrouvée est représentée par les douleurs osseuses chez 96% des patients. Ce chiffre est en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature où 67 à 90% des patients, présentent des lésions osseuses lors du diagnostic de MM [16, 41]. Le deuxième signe clinique est la pâleur cutanéomuqueuse retrouvée chez 28% des patients.

Le tableau biologique est dominé par l'anémie, souvent modérée, avec un taux d'hémoglobine aux alentours de 10 g/dl dans 42% des cas comparable aux données de la littérature [16,22].

La recherche du composant monoclonal par électrophorèse des protéines sériques a montré dans près de la majorité des patients prélevés, l'existence d'une gammopathie monoclonale (90%).

Cette proportion est comparable à celles publiées dans la littérature où environ 80% des cas de MM ont une électrophorèse des protéines positive [16,22].

Le résultat de l'immunofixation des protéines sériques est également en accord avec la littérature. Le composant monoclonal est dans 63% des cas, une IgG et une IgA chez 22% des patients. Enfin, chez 15% des patients, il s'agissait d'un MM à chaînes légères. Cette distribution du composant monoclonal correspond à celle des nombreuses séries publiées dans la littérature [16, 17, 22, 35, 40, 42, 43]. La répartition des chaînes légères κ et λ associées à la chaîne lourde monoclonale est comparable à celle trouvée dans la littérature [18], avec une proportion de deux tiers de chaînes légères κ et un tiers de chaînes de type λ .

Comme attendu dans le MM, l'albuminémie est basse dans la majorité des cas, avec une valeur médiane proche de celle trouvée dans les séries publiées dans la littérature, autour de 37 g/L [17, 35, 40, 43, 44]. Elle est même inférieure à 35 g/L dans plus d'un tiers des cas.

Dans notre série de patients, 12% présentent une atteinte de la fonction rénale, objectivée par une créatininémie supérieure à 20 mg/L, valeur seuil fixée par Durie et Salmon (49). Ce chiffre est en accord avec celui rapporté dans la littérature [18,28]. La β_2 m sérique, paramètre biologique de grande valeur pronostique dans le MM, est supérieure à 3,50 mg/L (valeur seuil de l'ISS) chez 57 % des patients et est en accord avec les données de la littérature [19], [83], [87] .

Du point de vue cytologique, le taux de plasmocytes malins médullaires évaluée en microscopie optique est un peu plus faible dans notre étude par rapport à celles des séries de la littérature avec une valeur médiane de 27% [16, 17, 44].

Les résultats de l'imagerie obtenus lors de l'exploration des lésions radiologiques rejoignent ceux de la littérature .Les lésions ostéolytiques prédominent et sont retrouvées dans plus de 80%des cas [27].

Deux types de classification ont été utilisés. Les résultats obtenus par la stadification de DS montrent que tous nos patients sont diagnostiqués tardivement .En effet, tous sauf un patient (stade II) étaient de stade III. Dans la classification ISS, 24% des patients sont de stade 3.

Du point de vue thérapeutique, il existe une grande hétérogénéité quant au choix du protocole d'induction utilisé, car les patients ont été préalablement traités dans leur centre hospitalier de résidence avant d'être orienté vers le deuxième et disponible centre d'autogreffe en Algérie.

Ainsi, le protocole VAD a été administré à 8% des patients. Suite au consensus national, le VAD est de plus en plus délaissé au profit des associations de chimiothérapie contenant du Bortézomib et/ou thalidomide. Dans notre étude, le Bortézomib a été prescrit chez 91% des patients et plus de la moitié sous l'association Bortézomib –dexaméthasone, chez 57% des patients.

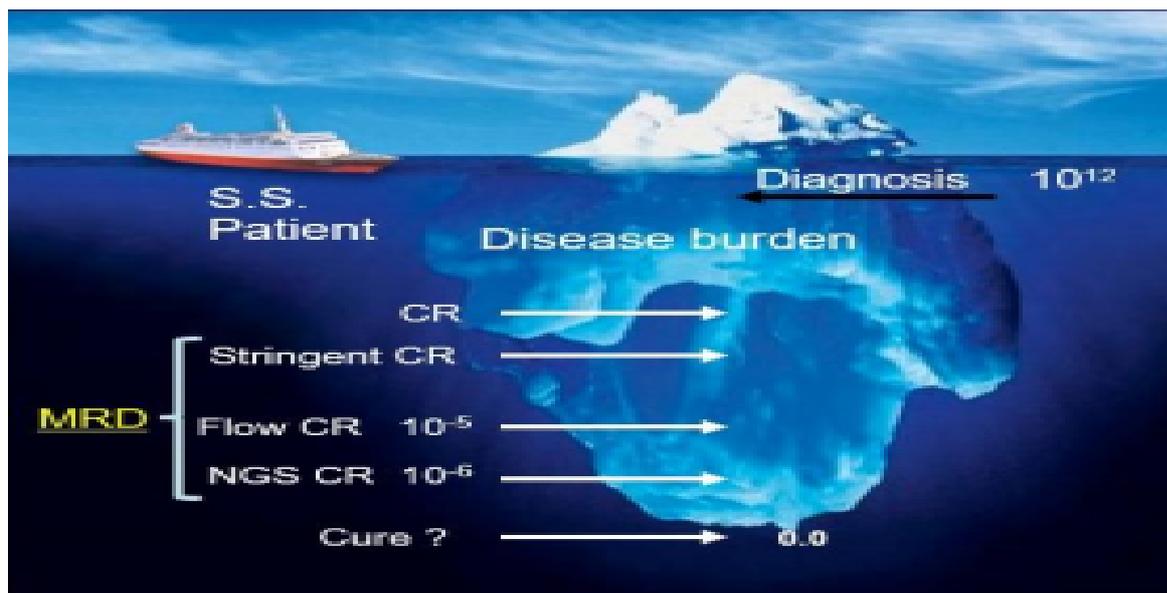
Ainsi, les résultats obtenus montrent un taux de réponse globale 88% dont 48% de TBRP et 40% de RC. Ces pourcentages se situent dans l'intervalle des résultats de la littérature, qui se situent entre 80%et 90% [88].

Tous les patients ont bénéficié d'un schéma thérapeutique intensif comportant une intensification et autogreffe de CSH. Aucun échec de mobilisation des CSH, par un facteur de croissance cellulaire, du G-CSF, à la dose de 15 μ g /kg/jour, n'a été enregistré. L'ensemble des patients a eu un recueil de CSH >2x10⁶/kg avec une médiane de 3,38x10⁶/kg (2 – 13,2). La prise de greffe des CSH est attestée par la remontée du taux des PNN mesurée en jours, et dont la médiane est de 10 jours (7 - 14), et celle du taux de plaquettes (en jours) et dont la médiane est de 13 jours (9 - 19). Aucun échec de prise de greffe n'a été noté et également aucun décès n'a

été relevé en termes de TRM (Transplant Related Mortality). Au cours de la phase d'aplasie, 68% des patients ont présenté une mucite de grade 3-4 et aucun patient n'a fait l'objet d'une infection grave de grade 3-4. En termes de prise de greffe, nos résultats sont identiques à ceux obtenus dans le MM dans les séries publiées.

L'évaluation de la réponse à J100 de l'intensification et autogreffe de CSH a objectivé une réponse globale de 100%. Le taux de RC observé dans notre travail, est passé de 40% à 80% en post autogreffe, ce qui rejoint les résultats de l'équipe d'Anderson et al [89] et ceux de l'IFM90. Ces résultats ont été évalués de façon conventionnelle avec la cytologie, l'électrophorèse des protéines et l'immuno sélection.

Avec l'évolution des nouvelles thérapies, la probabilité d'atteindre une réponse complète (RC) avec absence de pic au niveau de l'électrophorèse des protéines a augmenté, cependant il est observé que la plupart des patients finisse par rechuter. Ce constat est illustré par l'image de l'iceberg qui montre que, malgré l'absence de pic, la maladie peut être encore présente, ce qui a conduit au développement de la notion de maladie résiduelle. Cette dernière est évaluée par des méthodes d'analyse encore plus sensibles pour détecter et quantifier cette maladie résiduelle (MRD). La réponse moléculaire par l'étude de la MRD est une notion tout à fait récente dans l'évaluation des réponses post thérapeutique dans le MM. Cette étude de la MRD a été réalisée dans un premier temps par les techniques de cytométrie à 4 puis à 8 couleurs [90], puis sont apparues les nouvelles techniques de NGS qui permettent d'avoir des réponses moléculaires plus profondes [91].



Cependant, toutes ces techniques ne sont pas encore de pratique courante et seuls quelques laboratoires les réalisent en attendant d'une part la réduction de leurs coûts et d'autre part leurs standardisations. La cytométrie en flux est actuellement réalisable au niveau de la plupart des centres d'Hématologie du pays. Au niveau de l'EHU 1^{er} Novembre, la pratique de l'intensification suivie de l'autogreffe de CSH a conduit à la recherche de l'évaluation de la réponse post autogreffe la plus profonde possible. A cet effet, un protocole d'évaluation de la MRD a été mis en place à l'aide de la cytométrie en flux

Dans ce contexte, nous rapportons une expérience originale monocentrique sur l'utilisation de la CMF multiparamétrique à 8 couleurs dans la recherche et la quantification de la MRD. Dans notre travail, nous avons dans un premier temps validé la technique en procédant par la mise en place de plusieurs panels qui ont été testés au cours de trois procédures différentes.

Notre travail a été réalisé dans un premier temps en CMF quatre couleurs qui limitait l'étude des marqueurs d'intérêt. Par la suite, l'augmentation des capacités techniques du cytomètre en flux a considérablement amélioré les performances de l'analyse cytométrique. La combinaison de 3 lasers associée à l'utilisation de nombreux fluorochromes a permis d'étudier simultanément un nombre important de marqueurs à la surface de la même population cellulaire.

De même, le passage à la CMF multiparamétrique 8 couleurs avec 3 tubes puis 1 seul tube a permis d'associer, au niveau de la même analyse, les marqueurs de repérage de la population (triple identification) et les marqueurs de malignité. Cela a entraîné un gain en sensibilité et en spécificité, ce qui prend toute sa valeur dans l'évaluation de la maladie résiduelle. La deuxième et la troisième procédure expérimentées sont validées pour l'évaluation de la maladie résiduelle à partir du moment où l'immunophénotypage a permis de différencier les plasmocytes malins des plasmocytes normaux en mettant en évidence des aberrations dans le profil phénotypique des plasmocytes malins (Conformément aux recommandations internationales de CMF (EUROFLOW). Néanmoins c'est la dernière méthode qui est retenue pour la recherche de la MRD en raison du manque de spécificité des marqueurs CD28, CD117, CD20 utilisés. Le choix de notre panel a été guidé par les publications rapportées par la majorité des équipes effectuant la quantification de la maladie résiduelle en cytométrie en flux dans les MM qui utilisent le panel d'anticorps de base composé des marqueurs suivants le CD19, le CD45, le CD38, le CD138, le CD56, le CD27 [40], [92], [93]. A noter, que le panel utilisé a été testé sur du sang et des moelles de référence, objectivant le comportement des cellules physiologiques vis-à-vis des anticorps utilisés.

L'évaluation de la clonalité, aurait également contribué à isoler la population de plasmocytes malins monoclonaux et à les quantifier en s'appuyant sur l'étude de la restriction isotypique des

chaînes légères des immunoglobulines au sein de la population plasmocytaire totale. Cette étude de la clonalité n'a pas été recherchée dans notre travail, par manque de réactifs adéquats. Les anti-kappas et l'anti-lambda fournis étaient couplés soit au FITC, soit au PE, alors que nous utilisons déjà pour les 2 AC indispensables pour la détection des plasmocytes, l'anti CD38 en FITC et l'anti CD138 en PE.

Le pourcentage de PC médullaires totaux détectés par CMF était nettement plus élevé que celui estimé en cytologie. Pour quantifier l'infiltration plasmocytaire médullaire, la technique de CMF est beaucoup plus précise, le nombre d'éléments médullaires analysé étant élevé : 200 à 500 000 évènements par tube contre environ 500 cellules sur un myélogramme.

L'évaluation de la proportion de PC tumoraux par rapport aux PC totaux permet également de s'enquérir de l'hémodilution de l'échantillon. Dans la littérature, ce pourcentage est évalué dans la grande majorité des cas à partir d'un phénotype plasmocytaire aberrant (CD19-/CD56+) [97].

Ainsi au total 24 MRD positives ont été détectées lors de cette étude. A la date de point du 31/12/décembre 2017 et avec un suivi médian de 37,5 mois, nous avons relevé deux décès. La courbe de survie globale est de 96% à 106 mois et la médiane n'est pas atteinte.

L'évaluation de la MRD dans le myélome présente un intérêt clinique en termes de survie, plus la MRD est profonde et plus la durée de survie est longue [94]. Les groupes EMN et HOVON confirment que la cytométrie en flux est une technique réalisable, standardisable, reproductible et surtout prédictive de la survie sans progression en première ligne du MM éligible à l'autogreffe [95]. Dans notre série étudiée, la médiane de survie sans progression est de 90 mois. L'impact de la MRD a été établi en évaluant la survie globale et la survie sans rechute selon les résultats de l'évaluation de la MRD [96]. La comparaison selon le statut de la MRD positive ou négative, montre l'absence d'atteinte des médianes de survie au niveau des deux groupes de patients en cas de MRD+ et MRD-, mais en terme de moyenne de survie, celle des patients ayant une MRD- est nettement supérieure (103,4 *versus* 96,6mois) que celle des patients MRD+.

Nos résultats obtenus en termes de survie sans progression, sont comparables à ceux publiés, chez les patients ayant une MRD négative [43]. Cette constatation a été relevée dans notre série où les survies sans rechute sont respectivement de 33 mois pour le groupe MRD+ et une médiane non atteinte pour le groupe MRD- avec une différence très significative ($p=0,0001$). Ceci témoigne de l'importance de l'obtention d'une réponse thérapeutique profonde. Par contre, même avec une MRD négative, on n'observe pas de plateau. Par ailleurs, dans notre étude, l'analyse de la probabilité cumulée de rechute selon le statut de la MRD montre qu'en cas de

MRD+, 20% des patients ont rechuté, de façon précoce à 20 mois alors que pour le groupe MRD-, près de 10% des patients ont présenté une rechute tardive à trois ans.

La mise en place de cette plateforme en routine hospitalière est une nécessité aujourd'hui pour le suivi et le contrôle des rechutes des patients. Elle reste toutefois tributaire d'un approvisionnement régulier en réactifs. Son application permet de dépister précocement les rechutes et de mettre en route un traitement rapide. Quant à son coût s'il est comparé aux autres techniques d'évaluation de la MRD dans le MM, il est certainement le moins onéreux. En effet une appréciation des différentes procédures d'analyse avait été publiée par Bruno Paiva en 2014 montrant une nette différence en faveur de la CMF [50]. Il s'agit d'une technique rapide (moins de 2 heures) sensible qu'il reste toutefois à standardiser. A l'heure actuelle, les techniques de cytométrie en flux varient considérablement d'un centre à l'autre, au sein d'un même pays et dans le monde, et les résultats sont loin d'être uniformes. Il est par conséquent très difficile de comparer les données des essais cliniques. Une standardisation des procédures techniques et d'analyse (standardisation operating procédures ou SOP) initiée par l'EMN reste toutefois indispensable (panels d'anticorps étudiés, quantités d'anticorps utilisées, stratégies d'analyse pour l'identification des PC). Celle-ci permettrait de définir une sensibilité, une spécificité et des contrôles de qualité adéquats pour une application courante de la CMF dans l'étude des PC. Elle autoriserait de plus une comparaison inter-laboratoire des résultats. Parmi tous les travaux publiés, les approches d'Andy Rawstron en 2015 [95], ainsi que l'étude de Flores- Montero en 2016 se rapprochent de nos résultats [48].

Rawstron rapporte une étude cytométrique pour l'évaluation de la MRD dans le MM avec un panel à six couleurs sur deux tubes en utilisant huit AC (CD38, CD138, CD45, CD56, CD27, CD117, CD80). Le seuil de détection atteint est à moins de 0.01%. Ce seuil concorde avec ce qui a été obtenu dans notre étude, mais à moindre coût, avec un temps d'analyse réduit, l'utilisation de six AC uniquement et en effectuant une analyse unique sur un seul tube. Tout cela montre que le panel développé sur la présente étude, est non seulement fiable, spécifique et reproductible, mais également économique et rapide.

L'étude de Flores- Montero a par contre permis de dévoiler les limites de notre protocole. La moelle osseuse peut contenir plusieurs sous-groupes plasmocytaires plus précisément les PC réactifs qui présentent une hétérogénéité phénotypique. Par conséquent, une confirmation de la nature clonale par une évaluation cytoplasmique des chaînes légères est nécessaire. La combinaison des anti-kappas et des anti-lambdas à notre panel était impossible en termes de disponibilité des réactifs. Mais il est clair qu'en combinant notre panel avec l'évaluation

d'expression des chaînes légères, la sensibilité de détection des PC néoplasiques serait améliorée.

L'idéal serait également d'atteindre un seuil de sensibilité plus bas et d'analyser un plus grand nombre d'évènements. Ainsi, l'immunophénotypage par CMF des PC médullaires doit être actuellement considéré comme une analyse de routine pour l'évaluation post thérapeutique des patients atteints de MM.

Rapport-Gratuit.com

PERSPECTIVES

La MRD est devenue aujourd'hui un outil indispensable faisant partie des examens d'évaluation de la réponse post thérapeutique dans le MM.

Dans notre contexte local, la mise en place de la technique de détection de la maladie résiduelle au cours du MM est une première. En effet à l'échelle nationale, l'introduction de la notion de maladie résiduelle est devenue une réalité pour la mise en place de la technique au niveau de l'EHU d'Oran.

Cette technique simple d'évaluation de la réponse post thérapeutique, plus sensible que la cytologie ou l'électrophorèse des protéines ou le ratio FLC peut être implantée au niveau de tous les centres d'hématologie du pays possédant un cytomètre en flux.

Cependant, la CMF a aujourd'hui ses limites par rapport à la sensibilité de l'évaluation (10^{-4} , 10^{-5}). A la sensibilité de 10^{-4} (0,01%), on n'arrive pas à mettre en « dormance » les cellules malignes, il est fréquent que les patients rechutent à 2-4 ans. Pour une MRD négative à 10^{-6} (0,0001%), il est observé que 80% des patients bénéficient d'une période de rémission supérieure à 4 ans.

Pour Rawston et al. [95] la profondeur de la MRD est donc une notion importante qui devrait être prise en compte en routine à l'avenir! Mais dans notre contexte, un pas important a été franchi dans la prise en charge du MM en évaluant la maladie résiduelle par CMF, nous permettant ainsi de dépister à l'échelon infra clinique voir infra cytologique ou moléculaire, les rechutes. Donc, parmi les perspectives à atteindre, l'obtention d'un meilleur seuil de sensibilité est primordiale. L'idéal serait d'atteindre un seuil de l'ordre de 10^{-6} . Nous devrions également déterminer avec précision le moment opportun pour réaliser la détection de la MRD, après une chimiothérapie d'induction, ou après l'intensification ou après la consolidation.

Il faudra par ailleurs décider de l'attitude thérapeutique à adopter en fonction du résultat de l'étude MRD obtenue :

Ainsi en cas de MRD positive, les 3 bras s'offrent à nous : la poursuite du traitement, le changement de classe de médicament ou l'ajout d'une classe de médicament. Par contre en cas de MRD négative, les deux possibilités seraient l'arrêt du traitement ou la poursuite du traitement pour le maintien de la réponse obtenue.

Idéalement, l'identification d'un profil phénotypique particulier pour chaque patient atteint de MM au diagnostic serait utile au suivi de la maladie, et permettrait notamment d'optimiser l'évaluation de la maladie résiduelle. A noter également que dans des situations où les critères diagnostiques consensuels internationaux du MM sont pris en défaut, l'immunophénotypage plasmocytaire trouve tout son intérêt diagnostique.

Par ailleurs, le test sur la MRD permettra d'obtenir un nouveau critère d'évaluation utilisable dans les essais cliniques. Au lieu d'attendre de voir quel traitement permet la plus longue période de rémission ou la plus longue survie globale (période qui pourrait se prolonger d'une décennie ou davantage), le nouveau test de CMF apportera une réponse immédiate à la question : quel médicament ou schéma thérapeutique conduit au taux le plus faible de MRD chez le plus grand nombre de patients ?

CONCLUSION

Après plus de 20 ans de progrès en matière de traitement du myélome, grâce à l'introduction de nouvelles thérapies, il est désormais nécessaire pour les chercheurs de savoir comment éliminer les cellules myélomateuses qui subsistent après les traitements actuels.

Nous sommes aujourd'hui sur le point de disposer d'un test qui nous permettra d'avoir un plan d'action clair pour éradiquer la maladie résiduelle.

Ce test de cytométrie en flux très sensible et extrêmement précis se révèle être actuellement le test de détection de la maladie résiduelle le plus accessible dans nos conditions locales de travail. Cette approche axée sur l'utilisation du meilleur procédé de détection de la MRD pour dépister le myélome aux niveaux les plus faibles, laisse présager des résultats exceptionnellement positifs et peut servir de base de décision de traitements supplémentaires pour atteindre les réponses profondes et durables.

Difficultés rencontrées

Le sujet traité était particulièrement intéressant et ce travail m'a permis de découvrir la CMF. Ce travail m'a également permis de percevoir la difficulté, pour un laboratoire, de mettre au point une nouvelle technique.

Nous avons en effet rencontré quelques problèmes au moment de débiter notre travail, notamment à cause de réactifs qui n'étaient pas adaptés au départ puis en raison d'une rupture d'approvisionnement. De plus, il n'a pas été facile de tester et analyser tous les marqueurs dès le départ et nous avons certainement perdu un peu de temps. Nous avons plusieurs manières différentes de traiter ce travail, il nous a donc fallu un peu de temps pour pouvoir conjuguer la réalisation de ces différents protocoles de manière optimale.

Le tri des patients étudiés a été réalisé sur la base de données fournie aimablement par le personnel médical et le secrétariat du Pr BEKADJA chef de service du service d'hématologie de l'EHU 1er Novembre. D'ORAN

La réalisation du myélogramme a été effectuée après un consentement éclairé, verbal des patients et ce après les avoir informés sur l'intérêt et l'impact d'un tel examen sur leur suivi. Nous avons eu quelque réticences vu que pour certains l'électrophorèse des protéines et l'immunosélecton étaient le moyen de suivi habituel et surtout le moins invasif. L'acheminement des prélèvements et l'étude ont été immédiats, vu que le laboratoire se situe dans la même enceinte.

Ce travail a nécessité une grande collaboration avec l'équipe du laboratoire de cytométrie en flux de l'EHU 1er Novembre d'Oran, unité du Pr BRAHIMI. Nous avons donc dû apprendre à gérer notre temps en fonction de leur planning.

Au terme de ce travail, après avoir testés 3 techniques différentes d'étude de la MDR par CMF, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

Le constat général est que, parmi tous les protocoles étudiés, le troisième protocole est le plus fiable et le plus adapté. La réalisation d'une telle étude en routine hospitalière est nécessaire et utile. Elle reste toutefois tributaire d'un approvisionnement régulier en réactifs.

Son application permettra de dépister précocement les rechutes et de mettre en route un traite

LISTE DES ABREVIATIONS

CD	Cluster de Différenciation
Cytométrie en Flux	CMF
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
EMN	European Myeloma Network
EPS	Electrophorèse des protéines sériques
EPU	Electrophorèse des protéines urinaires
FISH	Fluorescent in situ hybridization
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
HLA	Human leukocyte antigen
ICAM	Inter cellular adhésion molécule
IEP	Immunoélectrophorèse
IF	Immunofixation
Ig	Immunoglobuline
IGF-1	Insulin growth factor-1
IGF-1R	Insulin growth factor-1 receptor
IL	Interleukine
IMWG	International Myeloma Working Group
IRM	Imagerie par resonance magnétique
ISS	International Staging System
MCP-1	Monocyte <i>chemoattractant protein-1</i>
MGG	May-Grünwald Giemsa
MGUS	Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α
Myélome Multiple	MM
Mn	Monoclonal
Maladie Résiduelle	MRD
NCAM	Neural Cell Adhésion Molécule
PBJ	Protéinurie de Bence Jones
PBS	Solution salée tamponnée au phosphate
PC	Plasmocytes
PCN	Plasmocytes normaux
PCR	Polymerase Chain Reaction

PE	Phycoérythrine
PerCP-Cy5.5	Peridin Chlorophyll-Cyanine 5.5
RANKL	Receptor Activator for Nuclear factor Kappa b ligand
RC	Réponse Complète
RCs	Réponse Complète Stricte
RP	Réponse Partielle
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor-1
SMM	Smoldering Myeloma
TBRP	Très bonne réponse partielle
TCR	T Cell Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
VCAM-1	Vascular Cell-Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA	Very Late Antigen
VS	Vitesse de Sédimentation

LISTE DES FIGURES

- Figure1 : Rôle des principales cytokines et chemokines dans la physiopathologie du myélome multiple
- Figure2 : Morphologie plasmocytaire
- Figure3 : Calendrier représentant l'histoire et le traitement du myélome multiple de 1844 à aujourd'hui
- Figure 4 : Composants majeurs d'un cytomètre en flux
- Figure 5 : Application de la focalisation hydrodynamique.
- Figure 6: Schéma d'un cytomètre de flux.
- Figure 7 : Identification des leucocytes dans le sang total
- Figure8 : Collecte des signaux par le système optique du cytomètre
- Figure 9: Exemple de trajet optique dans un cytomètre en flux
- Figure10 : Filtres
- Figure 11: Présentation des résultats en cytométrie en flux
- Figure 12: Illustration de marquage direct et indirecte des cellules
- Figure13 : Cytomètre BD FACSCanto
- Figure14 : Le banc optique du BD FACSCanto
- Figure 15: Stratégie de gating initial pour identifier les plasmocytes.
- Figure 16: Présentation d'une analyse immunophénotypique d'un témoin négatif
- Figure 17 : Stratégie d'analyse d'un témoin positif en MM pour identifier toutes les PC.
- Figure 18 : Présentation d'une analyse immunophénotypique d'un témoin positif.
- Figure 19 : Présentation comparative entre témoin positif et témoin négatif résultat d'un SPIKE
- Figure20 : Courbe Spike
- Figure 21: Stratégie d'analyse visant à sélectionner et identifier les cellules plasmocytaires par rapport à un ensemble hétérogène
- Figure 22 : Stratégie d'analyse étape de vérification par le témoin interne d'échantillon
- Figure 23: Représentation graphique des pourcentages des patients selon les résultats obtenus pour la présence ou l'absence de la MRD
- Figure24 : Survie globale
- Figure25 : Survie sans rechute des patients avec Myélome
- Figure26 : Survie sans rechute des patients selon MRD
- Figure 27: Incidence cumulée rechutes selon le statut

Liste des tableaux

- Tableau 1 : Les nouveaux critères diagnostiques du myélome multiple
- Tableau 2 : Classification de Durie et Salmon
- Tableau 3 : Classification ISS
- Tableau 4 : ISS révisé
- Tableau 5 : Principales drogues utilisées
- Tableau 6 : Échelle des antalgiques selon OMS
- Tableau 7 : Critères d'évaluation de réponse IMWG 2009
- Tableau 8: Nouveaux Critères d'évaluation de réponse IMWG 2011
- Tableau 9: Critères IMWG de MRD dans le myélome multiple
- Tableau 10 : Liste des antigènes de surface utiles pour la détection des Plasmocytes CD38 + CD138 + normaux et anormaux dans les MG
- Tableau 11 : Fiche de renseignement clinique et thérapeutique
- Tableau 12 : Classifications DS &ISS
- Tableau 13: Recommandations pour la prophylaxie de la thrombose
- Tableau 14 : Protocoles de chimiothérapie
- Tableau 15 : Panels d'anticorps monoclonaux utilisés lors du troisième protocole
- Tableau 16 : Résultats du SPIKE obtenus par CMF
- Tableau 17 : Les résultats du SPIKE déterminant la limite inférieure de détection
- Tableau 18 : Panel utilisé lors du premier protocole expérimental
- Tableau 19: Panel utilisé lors du deuxième protocole expérimental
- Tableau 20 : Données anthropologiques de la population étudiée.
- Tableau 21: Clinique
- Tableau 22 : Hémogramme
- Tableau 23: Protidogramme
- Tableau 24: Bilan radiologique
- Tableau 25 : Autres paramètres biologiques
- Tableau 26: Classification de Durie et Salmon et ISS
- Tableau 27: Protocoles de chimiothérapie d'induction
- Tableau 28 : Résultats thérapeutiques après chimiothérapie d'induction
- Tableau 29 : Résultats thérapeutiques post autogreffe de CSH
- Tableau 30 : Résultats thérapeutiques avant et post autogreffe de CSH
- Tableau 31 : Résultats obtenus chez 30 patients avec le deuxième protocole expérimental

Tableau 32 : Survie globale des patients atteints de MM à l'EHU Oran

Tableau 33 : Survie sans rechutes des patients atteints de MM à l'EHU Oran

Tableau 34: Comparaison des survies globales des patients ayant une MRD – ou MRD+

Tableau 35: Comparaison des survies sans rechute des patients ayant une MRD – ou MRD+

BIBLIOGRAPHIE: ARTICLES & AUTEURS

- [1] M. Cavo *et al.*, « International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation », *Blood*, vol. 117, n° 23, p. 6063-6073, juin 2011.
- [2] J. Bladé, L. Rosiñol, M. T. Cibeira, M. Rovira, et E. Carreras, « Hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma beyond 2010 », *Blood*, vol. 115, n° 18, p. 3655-3663, mai 2010.
- [3] S. K. Kumar *et al.*, « Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies », *Blood*, vol. 111, n° 5, p. 2516-2520, mars 2008.
- [4] J. Martinez-Lopez *et al.*, « Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation », *Blood*, vol. 118, n° 3, p. 529-534, juill. 2011.
- [5] J. Feuillard et M. Raphaël, « Différenciation lymphocytaire B et lymphomes B périphériques », *Hématologie*, vol. 6, n° 5, p. 345-59, déc. 2000.
- [6] Lise MORLON, « Intérêt de l'immunophénotypage plasmocytaire dans le myélome multiple ». UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I, 2010.
- [7] T. W. LeBien et T. F. Tedder, « B lymphocytes: how they develop and function », *Blood*, vol. 112, n° 5, p. 1570-1580, sept. 2008.
- [8] G. Jigo *et al.*, « Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells », *Blood*, vol. 94, n° 2, p. 701-712, juill. 1999.
- [9] C. Pellat-Deceunynck *et al.*, « Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells », *Blood*, vol. 84, n° 8, p. 2597-2603, oct. 1994.
- [10] R. Bataille *et al.*, « The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy », *Haematologica*, vol. 91, n° 9, p. 1234-1240, sept. 2006.
- [11] F. Medina, C. Segundo, A. Campos-Caro, I. González-García, et J. A. Brieva, « The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression », *Blood*, vol. 99, n° 6, p. 2154-2161, mars 2002.
- [12] R. Bataille, N. Robillard, H. Avet-Loiseau, J.-L. Harousseau, et P. Moreau, « CD221 (IGF-1R) is aberrantly expressed in multiple myeloma, in relation to disease severity », *Haematologica*, vol. 90, n° 5, p. 706-707, mai 2005.
- [13] J. F. S. Miguel, N. C. Gutiérrez, G. Mateo, et A. Orfao, « Conventional diagnostics in multiple myeloma », *Eur. J. Cancer*, vol. 42, n° 11, p. 1510-1519, juill. 2006.
- [14] J.-L. Harousseau, « Multiple Myeloma », *Hematology*, vol. 2004, n° 1, p. 237-256, janv. 2004.
- [15] R. Aggarwal, I. M. Ghobrial, et G. D. Roodman, « Chemokines in multiple myeloma », *Exp. Hematol.*, vol. 34, n° 10, p. 1289-1295, oct. 2006.

- [16]G. D. Roodman, « Pathogenesis of myeloma bone disease », *Leukemia*, vol. 23, n° 3, p. 435-441, mars 2009.
- [17]S. Barillé-Nion *et al.*, « Advances in biology and therapy of multiple myeloma », *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, p. 248-278, 2003.
- [18]R. A. Kyle *et al.*, « Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma », *Mayo Clin. Proc.*, vol. 78, n° 1, p. 21-33, janv. 2003.
- [19]P. R. Greipp *et al.*, « International Staging System for Multiple Myeloma », *J. Clin. Oncol.*, vol. 23, n° 15, p. 3412-3420, mai 2005.
- [20]P. Lin, R. Owens, G. Tricot, et C. S. Wilson, « Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma », *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 121, n° 4, p. 482-488, avr. 2004.
- [21]Bekadja MA et al, « 31ème congrès de la SFH d'hématologie, Paris ». 28mars-2014.
- [22]Zouaoui Z et al, « 31ème congrès de la SFH d'hématologie, Paris ». 28mars-2014.
- [23]C. A. Hutchison *et al.*, « Efficient removal of immunoglobulin free light chains by hemodialysis for multiple myeloma: in vitro and in vivo studies », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 18, n° 3, p. 886-895, mars 2007.
- [24]E. Desport *et al.*, « Traitement actuel de l'amylose AL », *Néphrologie Thérapeutique*, vol. 7, n° 6, p. 467-473, nov. 2011.
- [25]I. Christiaens, M. Laloux, et H. Reychler, [*Oral amyloidosis and multiple myeloma. Apropos of a case and review of the literature*], vol. 100. 1999.
- [26]J. Mehta et S. Singhal, « Hyperviscosity syndrome in plasma cell dyscrasias », *Semin. Thromb. Hemost.*, vol. 29, n° 5, p. 467-471, oct. 2003.
- [27]C. Touzeau et P. Moreau, « Multiple myeloma imaging. », *Diagn. Interv. Imaging*, vol. 94, n° 2, p. 190-192, févr. 2013.
- [28]International Myeloma Working Group, « Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group », *Br. J. Haematol.*, vol. 121, n° 5, p. 749-757, juin 2003.
- [29]S. V. Rajkumar, « Evolving diagnostic criteria for multiple myeloma », *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2015, p. 272-278, 2015.
- [30]N. Schneider, A. Wynckel, B. Kolb, É. Sablon, P. Gillery, et F.-X. Maquart, « Comparative analysis of immunoglobulin free light chains quantification by Freelite™ (The Binding Site) and N Latex FLC (Siemens) methods », *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, n° 1, p. 13-19, été 2013.
- [31]H. Avet-Loiseau *et al.*, « Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome », *Blood*, vol. 109, n° 8, p. 3489-3495, avr. 2007.
- [32]J. D. Tariman, « Changes in Cancer Treatment: Mabs, Mibs, Mids, Nabs, and Nibs », *Nurs. Clin. North Am.*, vol. 52, n° 1, p. 65-81, mars 2017.
- [33]D. J. Recktenwald, « Introduction to flow cytometry: principles, fluorochromes, instrument set-up, calibration », *J. Hematother.*, vol. 2, n° 3, p. 387-394, 1993.

- [34] M. Brown et C. Wittwer, « Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology », *Clin. Chem.*, vol. 46, n° 8 Pt 2, p. 1221-1229, août 2000.
- [35] M. R. Melamed, « A brief history of flow cytometry and sorting », *Methods Cell Biol.*, vol. 63, p. 3-17, 2001.
- [36] L. A. Herzenberg, D. Parks, B. Sahaf, O. Perez, M. Roederer, et L. A. Herzenberg, « The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford », *Clin. Chem.*, vol. 48, n° 10, p. 1819-1827, oct. 2002.
- [37] L. A. Herzenberg, R. G. Sweet, et L. A. Herzenberg, « Fluorescence-activated cell sorting », *Sci. Am.*, vol. 234, n° 3, p. 108-117, mars 1976.
- [38] Rafik TERRA, « LA CYTOMÉTRIE DE FLUX : UN RÔLE MAJEUR DANS LE DIAGNOSTIC DES NÉOPLASIES HÉMATOLOGIQUES », *LE LABEXPERT*, vol. 2, n° 4, déc. 2012.
- [39] « Flow cytometry introduction | Abcam ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>. [Consulté le: 29-juin-2017].
- [40] A. C. Rawstron *et al.*, « Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders », *Haematologica*, vol. 93, n° 3, p. 431-438, mars 2008.
- [41] « Equipment and Services- Microscopy - Shared Resources - UC San Diego Moores Cancer Center », *UC San Diego Health Sciences*. [En ligne]. Disponible sur: <https://healthsciences.ucsd.edu:443/research/moores/shared-resources/microscopy/Pages/equipment.aspx>. [Consulté le: 29-juin-2017].
- [42] « Anatomy of Fluorescence Spectra ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/ng/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/fluorescence-basics/anatomy-fluorescence-spectra.html>. [Consulté le: 29-juin-2017].
- [43] M. Arroz *et al.*, « Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting », *Cytometry B Clin. Cytom.*, vol. 90, n° 1, p. 31-39, janv. 2016.
- [44] B. Paiva *et al.*, « Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders », *Cytometry B Clin. Cytom.*, vol. 78, n° 4, p. 239-252, juill. 2010.
- [45] X. Ronot, *La cytométrie en flux*. Paris: Tec Doc [u.a., 2006.
- [46] R. A. Kyle et S. V. Rajkumar, « Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma », *Leukemia*, vol. 23, n° 1, p. 3-9, janv. 2009.
- [47] M. Perez-Andres *et al.*, « Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic », *Cytometry B Clin. Cytom.*, vol. 78B, n° S1, p. S47-S60, janv. 2010.
- [48] J. Flores-Montero *et al.*, « Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma », *Cytometry B Clin. Cytom.*, vol. 90, n° 1, p. 61-72, janv. 2016.

- [49] B. G. Durie et S. E. Salmon, « A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival », *Cancer*, vol. 36, n° 3, p. 842-854, sept. 1975.
- [50] R. Bataille, B. G. Durie, et J. Grenier, « Serum beta2 microglobulin and survival duration in multiple myeloma: a simple reliable marker for staging », *Br. J. Haematol.*, vol. 55, n° 3, p. 439-447, nov. 1983.
- [51] H. Avet-Loiseau *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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 30, n° 16, p. 1949-1952, juin 2012.
- [52] A. Palumbo *et al.*, « Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 33, n° 26, p. 2863-2869, sept. 2015.
- [53] V. Reed *et al.*, « Solitary plasmacytomas: outcome and prognostic factors after definitive radiation therapy », *Cancer*, vol. 117, n° 19, p. 4468-4474, oct. 2011.
- [54] A. Kumar, T. Loughran, M. Alsina, B. G. M. Durie, et B. Djulbegovic, « Management of multiple myeloma: a systematic review and critical appraisal of published studies », *Lancet Oncol.*, vol. 4, n° 5, p. 293-304, mai 2003.
- [55] R. Alexanian, B. Barlogie, et S. Tucker, « VAD-based regimens as primary treatment for multiple myeloma », *Am. J. Hematol.*, vol. 33, n° 2, p. 86-89, févr. 1990.
- [56] R. A. Kyle, S. Jacobus, W. R. Fridenberg, C. F. Slabber, S. V. Rajkumar, et P. R. Greipp, « The Treatment of Multiple Myeloma Utilizing Vincristine, Carmustine (BCNU), Melphalan, Cyclophosphamide, and Prednisone (VBMCP) Alternating with High-Dose Cyclophosphamide and Alpha2 Beta-Interferon Versus VBMCP », *Cancer*, vol. 115, n° 10, p. 2155-2164, mai 2009.
- [57] S. Singhal *et al.*, « Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 341, n° 21, p. 1565-1571, nov. 1999.
- [58] L. Benboubker *et al.*, « Lenalidomide and Dexamethasone in Transplant-Ineligible Patients with Myeloma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 371, n° 10, p. 906-917, sept. 2014.
- [59] M. Q. Lacy et A. R. McCurdy, « Pomalidomide », *Blood*, vol. 122, n° 14, p. 2305-2309, oct. 2013.
- [60] P. G. Richardson *et al.*, « A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, n° 26, p. 2609-2617, juin 2003.
- [61] A. K. Stewart *et al.*, « Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, n° 2, p. 142-152, janv. 2015.
- [62] S. K. Kumar *et al.*, « Safety and tolerability of ixazomib, an oral proteasome inhibitor, in combination with lenalidomide and dexamethasone in patients with previously untreated multiple myeloma: an open-label phase 1/2 study », *Lancet Oncol.*, vol. 15, n° 13, p. 1503-1512, déc. 2014.
- [63] T. Plesner *et al.*, « Safety and Efficacy of Daratumumab with Lenalidomide and Dexamethasone in Relapsed or Relapsed, Refractory Multiple Myeloma », *Blood*, vol. 124, n° 21, p. 84-84, déc. 2014.

- [64] S. Lonial *et al.*, « Elotuzumab in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 30, n° 16, p. 1953-1959, juin 2012.
- [65] J. F. San-Miguel *et al.*, « Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial », *Lancet Oncol.*, vol. 15, n° 11, p. 1195-1206, oct. 2014.
- [66] J.-P. Fermand, « Traitement intensif et autogreffe en traitement initial du myélome : la fin d'une époque ? », *Hématologie*, vol. 13, n° 4, p. 230-232, juill. 2007.
- [67] G. Gahrton *et al.*, « Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Multiple Myeloma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 325, n° 18, p. 1267-1273, oct. 1991.
- [68] B. Barlogie *et al.*, « Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321 », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 24, n° 6, p. 929-936, févr. 2006.
- [69] H. M. Lokhorst *et al.*, « Partially T-cell-depleted allogeneic stem-cell transplantation for first-line treatment of multiple myeloma: a prospective evaluation of patients treated in the phase III study HOVON 24 MM », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 21, n° 9, p. 1728-1733, mai 2003.
- [70] B. G. M. Durie *et al.*, « International uniform response criteria for multiple myeloma », *Leukemia*, vol. 20, n° 9, p. 1467-1473, sept. 2006.
- [71] M. Attal *et al.*, « Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 376, n° 14, p. 1311-1320, avr. 2017.
- [72] L. Garderet *et al.*, « Upfront autologous stem cell transplantation for newly diagnosed elderly multiple myeloma patients: a prospective multicenter study », *Haematologica*, vol. 101, n° 11, p. 1390-1397, nov. 2016.
- [73] M. Mohty, « Traitement de première ligne du myélome du sujet âgé : mise au point », *Hématologie*, vol. 19, n° 1, p. 41-46, janv. 2013.
- [74] Weltgesundheitsorganisation, Éd., *Traitement de la douleur cancéreuse: complétée par une analyse des problèmes liés à la mise à disposition des opioïdes*, 2. éd. Genève, 1997.
- [75] D. Vesole *et al.*, « Oral antibiotic prophylaxis of early infection in multiple myeloma: a URCC/ECOG randomized phase III study », *Leukemia*, vol. 26, n° 12, p. 2517-2520, déc. 2012.
- [76] M. Macro, B. Arnulf, et X. Leleu, « Le myélome multiple de l'IMW à l'EHA, 2011 : un grand cru », *Hématologie*, vol. 17, n° 8, p. 3-41, déc. 2011.
- [77] M. Cazzola *et al.*, « Recombinant human erythropoietin in the anemia associated with multiple myeloma or non-Hodgkin's lymphoma: dose finding and identification of predictors of response », *Blood*, vol. 86, n° 12, p. 4446-4453, déc. 1995.

- [78] C. Hulin, M. Roussel, L. Karlin, L. Benboubker, B. Arnulf, et X. Leleu, « Guide pratique pour le traitement de première rechute du myélome multiple », *Hématologie*, vol. 20, n° 4, p. 208-225, juill. 2014.
- [79] P. Tosi, S. Tomassetti, A. Merli, et V. Polli, « Serum free light-chain assay for the detection and monitoring of multiple myeloma and related conditions », *Ther. Adv. Hematol.*, vol. 4, n° 1, p. 37-41, févr. 2013.
- [80] M. E. Sarasquete *et al.*, « Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry », *Haematologica*, vol. 90, n° 10, p. 1365-1372, oct. 2005.
- [81] M. Fulciniti, N. C. Munshi, et J. Martinez-Lopez, « Deep Response in Multiple Myeloma: A Critical Review », *BioMed Research International*, 2015. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/832049/>. [Consulté le: 03-févr-2018].
- [82] C. Nanni *et al.*, « Image interpretation criteria for FDG PET/CT in multiple myeloma: a new proposal from an Italian expert panel. IMPeTUs (Italian Myeloma criteria for PET USE) », *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 43, n° 3, p. 414-421, mars 2016.
- [83] G. Mateo *et al.*, « Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 26, n° 16, p. 2737-2744, juin 2008.
- [84] N. Becker, « Epidemiology of multiple myeloma », *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer*, vol. 183, p. 25-35, 2011.
- [85] G. Mateo *et al.*, « Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 11, n° 10, p. 3661-3667, mai 2005.
- [86] B. Paiva *et al.*, « Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation », *Blood*, vol. 112, n° 10, p. 4017-4023, nov. 2008.
- [87] G. S. Nowakowski *et al.*, « Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma », *Blood*, vol. 106, n° 7, p. 2276-2279, oct. 2005.
- [88] P. Moreau, M. Attal, et T. Facon, « Frontline therapy of multiple myeloma », *Blood*, vol. 125, n° 20, p. 3076-3084, mai 2015.
- [89] K. C. Anderson *et al.*, « Clinically relevant end points and new drug approvals for myeloma », *Leukemia*, vol. 22, n° 2, p. 231-239, févr. 2008.
- [90] J. Martínez-López *et al.*, « Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: contribution of sFLC and bone marrow clonality », *Blood*, vol. 126, n° 7, p. 858-862, août 2015.
- [91] O. Landgren et R. G. Owen, « Better therapy requires better response evaluation: Paving the way for minimal residual disease testing for every myeloma patient », *Cytometry B Clin. Cytom.*, vol. 90, n° 1, p. 14-20, janv. 2016.

- [92]N. C. Munshi et K. C. Anderson, « Minimal residual disease in multiple myeloma », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 31, n° 20, p. 2523-2526, juill. 2013.
- [93]N. C. Munshi et K. C. Anderson, « Reply to M. Roschewski et al », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 32, n° 5, p. 478, févr. 2014.
- [94]O. Landgren, S. Devlin, M. Boulad, et S. Mailankody, « Role of MRD status in relation to clinical outcomes in newly diagnosed multiple myeloma patients: a meta-analysis », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 51, n° 12, p. 1565-1568, déc. 2016.
- [95]A. C. Rawstron *et al.*, « Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 31, n° 20, p. 2540-2547, juill. 2013.
- [96]N. C. Munshi *et al.*, « Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis », *JAMA Oncol.*, vol. 3, n° 1, p. 28-35, janv. 2017.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent tout d'abord aux membres du jury.

A M. le Pr SIDI MANSOUR

Vous me faites l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse et de juger mon travail.

Je vous en remercie profondément.

A Mr le Pr BEKADJA mon directeur de thèse,

Tout d'abord merci de m'avoir accordée ta confiance et d'avoir acceptée de m'encadrer durant ces trois années. Tu as été une rencontre déterminante dans ma profession et j'ai vraiment apprécié de travailler avec toi. Je te suis particulièrement reconnaissante de m'avoir fait partager tes connaissances. Merci également de m'avoir accompagnée et encouragée durant tout ce temps.

A Mme le Pr MESLI

Merci pour tous les souvenirs partagés. Malgré les distances imposées, mon affection pour toi restera inchangée. Merci beaucoup pour l'honneur que tu me fais en acceptant de faire partie de mon jury et de juger mon travail.

A Mr le Pr BRAHIMI

Je te remercie de m'avoir accueilli au sein de ton unité. Tu m'as accordé beaucoup de ton temps et fourni de précieux conseils pour la réalisation de ce travail et c'est un grand honneur que tu me fais d'accepter de faire partie de mon jury.

A toute l'équipe de l'unité de cytométrie de l'EHU 1er Novembre d'Oran, au personnel médical et para médical du service d'hospitalisation de l'EHU 1er Novembre d'Oran : Merci pour leur contribution à l'exécution de ce travail et leur bonne volonté quotidienne.

Une pensée particulière à ma famille : Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut, tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, la reconnaissance que je leur porte.