

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

Tenant lieu de

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

le 17 juin 2016

par

Julien COSTES

né(e) le 26 juillet 1988, à Rodez (12)

**Imagerie *in-vivo* du microenvironnement tumoral du myélome
multiple par TEMP/CT**

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur Franck SAINT-MARCOUX

M^{me} le Docteur Charlotte FONTAN

M^{me} le Docteur Jill CORRE

M. le Docteur J.A.M TAFANI

M. le Docteur Florent PUISSET

M. le Docteur Benjamin HEBRAUD

Président

Directeur

Juge

Juge

Juge

Juge



Thèse d'exercice

Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2016

Thèse N°

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

Tenant lieu de

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

le 17 juin 2016

par

Julien COSTES

né(e) le 26 juillet 1988, à Rodez (12)

**Imagerie in-vivo du microenvironnement tumoral du myélome
multiple par TEMP/CT**

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur Franck SAINT-MARCOUX

M^{me} le Docteur Charlotte FONTAN

M^{me} le Docteur Jill CORRE

M. le Docteur J.A.M TAFANI

M. le Docteur Florent PUISSET

M. le Docteur Benjamin HEBRAUD

Président

Directeur

Juge

Juge

Juge

Juge



LISTE DES ENSEIGNANTS

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE



CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE



VIGNOLES Philippe

BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET
INFORMATIQUE

PROFESSEUR DE LYCEE PROFESSIONNEL :

ROUMIEUX Gwenhaël

ANGLAIS

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

CHEMIN Guillaume

(01.09.2015 au 31.08.2016)

BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET CLINIQUE,
CANCEROLOGIE

FABRE Gabin

01.10.2015 au 31.08.2016)

CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques

DREYFUSS Gilles

LOUDART Nicole



REMERCIEMENTS

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

A M. le Pr Franck Saint-Marcoux, président du jury :

Vous me faites l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse et de juger mon travail. Je vous en remercie profondément.

A Mme le Docteur Charlotte Fontan, ma directrice de thèse :

Tout d'abord merci de m'avoir accordé ta confiance et d'avoir accepté de m'encadrer durant ces trois années. Tu as été une rencontre déterminante dans mon internat et j'ai vraiment apprécié de travailler avec toi. Je te suis particulièrement reconnaissant de m'avoir fait partager tes connaissances, ta passion pour la radiopharmacie et la recherche. Merci également de m'avoir accompagné et encouragé durant tout ce temps et j'espère sincèrement pouvoir continuer de travailler avec toi.

A M. le Dr J.A.M Tafani :

Merci beaucoup de m'avoir accueilli au sein de ton unité, de m'avoir accordé ta confiance et encouragé durant toutes ces années. Merci également de ton soutien pour la réalisation de mes projets à venir et d'avoir contribué à ma formation de futur radiopharmacien. Tu fais partie des personnes qui auront beaucoup compté et ta présence dans ce jury m'était importante.

A Mme le Docteur Jill Corre :

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre équipe durant cette année recherche. Vous m'avez accordé de votre temps et fourni de précieux conseils pour la réalisation de ce travail et c'est un grand honneur que vous me faites d'accepter de faire partie de mon jury.

A M. le Docteur Florent Puisset :

Un grand merci pour ces deux semestres passés. Ton dynamisme, ta rigueur et ton investissement sont des qualités que j'admire et qui me rendent fiers d'exercer mon futur métier. C'est pour ces raisons que ta présence dans mon jury est importante pour moi.

A M. le Docteur Benjamin Hébraud :

Merci beaucoup pour l'honneur que vous me faites d'accepter de faire partie de mon jury et de juger mon travail.

A mes parents : qui m'ont tant soutenu durant ces dix (longues) années d'études et sans qui je n'y serais jamais arrivé. Vous avez été là pour m'accompagner et avez toujours cru en



moi-même durant les périodes les plus difficiles. Aujourd'hui, vous êtes à nouveau à mes côtés pour cette journée si particulière pour moi. Aucun mot ne pourra décrire toute la reconnaissance que j'ai pour vous.

A mon frère : merci pour tous ces moments et tous ces souvenirs partagés. Malgré les distances imposées par nos obligations professionnelles, mon affection pour toi restera inchangée.

A mes grands-parents : merci pour toutes ces années passées avec vous depuis ma tendre enfance. Il m'est difficile d'exprimer tout l'amour que j'ai pour vous.

A ma famille : merci à mes cousins, cousines, oncles et tantes pour tous ces moments passés avec vous !

A toute l'équipe de la radiopharmacie toulousaine : Mathieu, Anne-Sophie et Alice pour leur contribution à ma formation et leur bonne humeur quotidienne. Mathieu, le temps passe et ton niveau au baby est toujours aussi faible...Je remercie également l'équipe des préparateurs (Nico, FX, Céline, Bérengère, Jamel, Farid, Cécile, Caro et Thomas) pour leur accueil durant ces deux semestres. Spéciale dédicace pour Nico Gros Paquet, FX double queue, Black Swan et Béber pour ces fous rires mémorables. Je n'oublierai jamais ces mois passés avec vous !

A l'équipe 13 du CRCT : merci à M. Avet-Loiseau de m'avoir accueilli au sein de votre équipe pour mon master 2. Merci à l'ensemble de l'équipe 13 et à l'UGM pour votre accueil. Merci à Nadège, Virginie et Marie pour vos conseils et votre disponibilité durant cette année. Un point spécial pour Marie-Véronique-Monique-Joëlle (Larouso) pour ces batailles d'éthanol endiablées dans les couloirs du labo ! Arrête de te faire du mal à Duel Quizz, tu n'as pas le niveau !

Je remercie également Bettina Couderc de m'avoir initié à la vectorologie virale et pour vos précieux conseils tout au long de mon année recherche ainsi que pour la rédaction de ma thèse.

Merci à Augustin, Renaud, Diane-Charlotte Imbeuss et Loïc pour ses grands moments d'intelligence à la salle de pause !

A l'équipe de l'ICR et de l'IUC : Merci aux pharmaciens et préparateurs(trices) pour ces deux semestres passés en votre compagnie. Merci en particulier à M. Canonge pour vos conseils et votre aide de ces derniers mois pour le montage des dossiers de bourse de thèse. Merci Anaïs, j'ai énormément apprécié de travailler avec toi durant mon semestre à



l'ICR, à Audrey et Marie Nono pour votre disponibilité durant ces 6 mois à l'IUC. Merci également à Sofiste, Sexcile et Meuh Meuh pour ces pauses goûté, ces énormes fous rires et cette soirée mémorable au bazar ! Tu vois Sophie, je ne suis pas rancunier, j'ai décidé de te pardonner malgré toutes tes infidélités et les nombreux lapins que tu m'as posés. Emeline, ne m'attends pas ce soir, je risque de rentrer tard... Je place aussi une dédicace aux chaussettes de Florent...

Aux autistes limougeauds : JC et Denis, mes premières rencontres à Limoges (et quelles rencontres !!) ainsi qu'Alex Fofo (Guy la machette, Salomon...) pour ces soirées improbables dans la capitale de la fête. Je pense que l'on aura largement contribué à ce que les bistrot Limougeauds ne connaissent pas la crise. Keud, Flal (et cette rencontre mémorable au crit d'Argeles), GSM, Diane, Anne, Coin, Fred (le quota), Quentin... pour toutes ces années inoubliables !

Aux toulousains : aux amis rencontrés durant mes années de fac : Carlito alias Rudy et Vincent. Vous avez beau être des tarnais doryphores, je vous aime bien et vous me faites bien rire ! Tintin, Coco et JR, trois des plus grands abrutis et petits foies que j'ai rencontré ! Mamie Vachier, le poids des années se faisant sentir, on va te ménager pour ce soir. Merci aussi à Bérengère, Céline et Mikel et mon vieux Barni.

Merci également aux internes toulousains : Jeanne, Cécile, Paupiette (le lave-vaisselle), Guigui, Quentin, Corentin, Léa, Gaëlle, Vomille, Soso et Elise pour ce semestre à l'IUC de haut vol, Alicia et son taille G pour ces 6 mois à l'ICR avec encore une fois Vomille (le coloc le plus idiot qu'il soit possible d'avoir !), M. Mocquot, coloc de Saclay où l'on aura encore une fois fait avancer la science, Damien, Pierre Lecul, Patrick et Benoît pour cette première année d'internat limougeaude qui a bien posé les bases. Une petite dédicace pour le TFC (je vais m'abstenir de donner la signification) et aux deux co-présidentes Elise et Soso.



DROITS D'AUTEURS

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

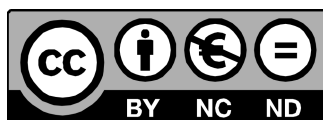


TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTS.....	4
REMERCIEMENTS.....	7
DROITS D'AUTEURS	10
TABLE DES MATIERES	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	13
TABLE DES TABLEAUX.....	15
LISTE DES ABREVIATIONS.....	16
INTRODUCTION.....	19
1 ^{ere} PARTIE : RAPPELS SUR LA LIGNEE PLASMOCYTAIRE	21
I. La lymphopoïèse B	21
1) Les molécules de la lignée lymphoïde B.....	21
2) Phases intra-médullaires.....	22
3) Phases extra-médullaires.....	24
4) Morphologie des plasmocytes.....	26
II. Les immunoglobulines.....	27
1) Structure générale des anticorps.....	27
2) Les différentes classes d'immunoglobulines.....	28
3) Génétique de la structure des immunoglobulines.....	30
2 ^e PARTIE : LE MYELOME MULTIPLE.....	35
I. Pathologie tumorale.....	35
1) Définition.....	35
2) Epidémiologie.....	35
3) Physiopathologie.....	35
4) Complications : physiopathologie et conséquences cliniques.....	38
5) Biologie du myélome multiple.....	42
6) Diagnostic.....	51
7) Critères pronostiques.....	54
8) Prise en charge thérapeutique.....	58
II. Le microenvironnement tumoral.....	66
1) Définition du microenvironnement.....	66
2) Rôles du microenvironnement dans la physiopathologie du myélome.....	66
3) Etude du microenvironnement tumoral.....	70



3 ^e PARTIE : Imagerie <i>in-vivo</i> du microenvironnement tumoral.....	90
I. Matériels et Méthodes.....	90
1) Lignées cellulaires, réactifs.	90
2) Production des vecteurs viraux.....	91
3) Test d'expression de NIS par RTq-PCR.	94
4) Test de fonctionnalité de NIS (captation in-vitro du ^{99m} TcO ₄ ⁻ par les MSCs transfectées avec NIS).	95
5) Imagerie in-vivo sur le petit animal.	95
II. Résultats.....	96
1) Génération des plasmides.....	96
2) Production des particules virales.	97
3) Test d'intégrité de NIS :	100
4) Test de fonctionnalité de NIS.	101
5) Imagerie in-vivo.....	102
DISCUSSION.....	106
CONCLUSION	110
REFERENCES.....	111
SERMENT DE GALIEN.....	123



TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Complexe moléculaire du BCR à la surface des cellules B.....	22
Figure 2 : Maturation intra-médullaire des précurseurs des lymphocytes B.	23
Figure 3 : Evolution du phénotype des lymphocytes B au cours de l'immunopoïèse	24
Figure 4 : Interaction entre un lymphocyte T CD4 et un lymphocyte B naïf.....	25
Figure 5 : Maturation et sélection des lymphocytes B au sein des ganglions lymphatiques. .	26
Figure 6 : Observation par coloration au MGG de plasmocyte issu de frottis médullaires.	27
Figure 7 : Structure générale d'une Ig	28
Figure 8 : Structures générales des différentes classes d'immunoglobulines	29
Figure 9 : Organisation des gènes codant pour les Ig.....	31
Figure 10 : Réarrangement des gènes des chaînes lourdes d'Ig et formation du pré BCR. ...	32
Figure 11 : Commutation isotypique des Ig. Exemple de formation des IgG1.	34
Figure 12: Différentes étapes de l'oncogenèse du myélome multiple.	38
Figure 13 : Physiopathologie de l'activation ostéoclastique.	39
Figure 14 : Electrophorèse des protéines sériques.....	43
Figure 15 : Immunofixation des protéines sériques.....	43
Figure 16 : Immunofixation des protéines urinaires	44
Figure 17 : Principe de la mesure des FLC.....	45
Figure 18: Hématies en rouleau visualisées sur frottis sanguin.	47
Figure 19 : Aspects morphologiques des plasmocytes selon leur stade de maturation.....	49
Figure 20 : Algorithme de détermination du stade de maturation des plasmocytes tumoraux	49
Figure 21 : Inclusions cytoplasmiques correspondant aux cellules de Mott (a) et inclusions nucléaires correspondant aux corps de Dutcher (b) (cercle rouge).....	50
Figure 22 : Plasmocytes à cytoplasme flammé (a), à noyau irrégulier polylobé (b) ou à aspect d'haltère (c). Inclusions cristalloïdes intracytoplasmiques (d).....	51
Figure 23 : Action du Bortézomib dans le Myélome Multiple.....	59
Figure 24 : Action du Bortézomib sur la voie NF-kB	60



Figure 25 : Schéma récapitulatif des traitements d'induction pré-greffe en fonction des niveaux de risque de la maladie.	62
Figure 26 : Modes d'interactions entre plasmocytes tumoraux et MSCs.	68
Figure 27 : Rôle des MSCs dans les perturbations osseuses observées.	69
Figure 28: Transfection de gènes rapporteurs (GFP) puis visualisation in-vitro	73
Figure 29 : Imagerie optique <i>in-vivo</i> de plasmocytes tumoraux.	73
Figure 30 : Principe de la bioluminescence.	74
Figure 31 : Visualisation <i>in-vivo</i> de lignées de cellules myélomateuses.	74
Figure 32 : (A) exemple de scintigraphie osseuse (B) exemple de scintigraphie thyroïdienne.	76
Figure 33 : Principe général de la TEP.	76
Figure 34 : Schéma du fonctionnement de NIS au sein des cellules thyroïdiennes.	79
Figure 35 : Etapes nécessaires pour le transfert génique dans une cellule hôte.	80
Figure 36 : Mécanisme d'intégration des liposomes dans le génome des cellules hôtes.	83
Figure 37 : Schéma du génome viral	87
Figure 38 : Schéma d'une particule virale de lentivirus.	87
Figure 39 : Plasmides pour vecteurs lentiviraux de première génération.	88
Figure 40 : Schéma du cycle viral des lentivirus	89
Figure 41: Cartographie des plasmides utilisés	92
Figure 42: Profil de migration des fragments de pLVX-TetOne-Puro-NIS sur gel d'agarose	97
Figure 43: Visualisation des cellules HEK293T après transfection par le plasmide codant GFP.	98
Figure 44: Visualisation des MSCs après transduction par le plasmide codant la GFP.	99
Figure 45: Tri cellulaire par FACS et puromycines des MSCs	100
Figure 46: Quantification de l'expression de NIS	101
Figure 47: Evolution de la captation in-vitro du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ au cours du temps	102
Figure 48: Images TEMP planaires des souris et images TEMP couplée au scanner	103
Figure 49 : Variabilités interindividuelles des nombres moyens de coups par pixels.	105



TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Présentation des différentes formes cliniques du MM au cours de l'évolution de la maladie.....	53
Tableau 2 : Tableau de la classification de Durie et Salmon (1975).....	55
Tableau 3 : Tableau de la classification ISS	56
Tableau 4 : Tableau de classification des anomalies cytogénétiques mSMART	57
Tableau 5: Tableau récapitulatif des différents protocoles de chimiothérapies d'induction....	61
Tableau 6 : Comparaison des différentes techniques d'imagerie disponibles chez le petit animal.	78
Tableau 7 : Exemples de lipides cationiques utilisés comme vecteur de transfert génique...84	
Tableau 8: Comparaison du nombre moyen de coups mesurés au niveau de la patte injectée par rapport à la patte opposée pour chaque souris.....	104
Tableau 9: Comptage du nombre de coups par minute (CPM) détectés dans les pattes injectées et non injectées par compteur gamma.....	105



LISTE DES ABREVIATIONS

AAV: Adenovirus Associated Vector.
ADCC: Antibody Dependant Cell Toxicity.
ADN : Acide Desoxyribonucléique.
ADNc: Acide Desoxyribonucléique complémentaire.
ARN : Acide Ribonucléique.
ATP: Adénosine TriPhosphate.
BCR : B Cell Receptor.
CCL3: C-C motif Chemokine Ligand 3.
CD : Cluster de Différenciation.
CMV : Cytomégalovirus.
CO₂: Dioxyde de carbone.
CRP: C Reactive Protein.
CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques.
CT: Computered Tomography.
Da : Dalton.
DKK: Dickkopf protein.
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.
Dox: doxyxycline.
EPS: Electrophorèse des Protéines Sériques.
EPU: Electrophorèse des Protéines Urinaires.
¹⁸F_{FDG}: [¹⁸F]Fluorodésoxyglucose.
FGFR: Fibroblast Growth Factor
FISH: Fluorescence Hybridation In-Situ.
FLC: Free Light Chain.
GDF-15: Growth Differentiation Factor 15.
GEP: Gene Expression Profiling.
GFP : Green Fluorescent Protein.
G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor.
Hb: Hémoglobine.
HSV: Herpes Simplex Virus.
ICAM: Intercellular Adhesion Molecule.
IGF-β: Insuline like Growth Factor β
Ig : Immunoglobuline.
IL : Interleukine.



IMiD: Immunomodulateur.

IMWG: International Myeloma Working Group.

IP: Inhibiteur du Proteasome.

ISS: International Staging System.

IV: Intraveineuse.

Kb: kilo bases.

keV: kilo electron volt

LDH: Lactate Déshydrogénase.

MGG: May-Grünwald Giemsa.

MGUS : Monoclonal Gammopathie of Unknown Significance.

MES: Minimum Essential Medium.

MM : Multiple Myeloma.

MMP : Metalloprotéinase Matricielle.

MMSET : Multiple Myeloma SET domain.

MRP: Médicament Radiopharmaceutique.

MSCs: Mesenchymal Stem Cell.

mSMART: Mayo Stratification for Myeloma and Risk Adapted Therapy.

NF-κB: Nuclear Factor κB.

NFS: Numération de la Formule Sanguine.

NIS: Sodium Iodide Symporter.

NK: Natural Killer.

NSG : NOD/SCID gamma IL-2.

OPG: Ostéoprotégérine.

PCLI : Plasma Cell Labelling Index.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PEI: polyéthylèneimine.

PLL: ppolylysine.

RANK/RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor κB.

ROTI: Related Organ or Tissue Impairment.

rpm: round per minute.

SCF: Stem Cell Factor.

SCID/NOD-SCID: Severe Combined Immunodeficiency Disease. / Non Obese and Diabetic SCID.

SMM: Smoldering Multiple Myeloma.

SVF: Serum de Veau Fœtal.

$^{99m}\text{Tc}/\text{TcO}_4^-$: Technétium 99 métastable. / ion pertechnétate

TCR: T Cell receptor.



TEMP: Tomographie par Emission Monophotonique.

TEP: Tomographie par Emission de Positons.

Tg: Thyroglobuline.

TNF: Tumor Necrosis Factor.

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

VLA-4: Very Late Antigen 4.

VS: Vitesse de sedimentation.

VSV-G: Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein.



INTRODUCTION

Le myélome multiple (MM), deuxième hémopathie maligne derrière le lymphome, est caractérisé par l'accumulation d'un clone de plasmocytes tumoraux ainsi que par une sécrétion excessive d'immunoglobuline monoclonale dans la circulation sanguine. Cette accumulation plasmocytaire se localise principalement au sein de la moelle osseuse même s'il existe des localisations extramédullaires.

Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques bien définis tels que la présence d'une infiltration plasmocytaire au sein de la moelle osseuse, la présence d'une immunoglobuline monoclonale plasmatique et/ou urinaire, l'anémie, la calcémie, une altération de la fonction rénale et l'identification de lésions osseuses. Ces derniers sont aussi utilisés pour établir des classifications pronostiques de la maladie afin d'adapter la prise en charge du patient. Parmi celles-ci, on trouve la classification de Durie et Salmon établie en 1975 puis l'International Staging System mise en place en 2005. Plus récemment, des mutations ont été identifiées de façon plus ou moins fréquente. Elles peuvent avoir une valeur pronostique et prédictive sur la sensibilité aux traitements.

La prise en charge thérapeutique dépend de l'âge des patients. Les plus jeunes d'entre eux (moins de 65 ans) sont éligibles à l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques associée à des cycles d'induction et de consolidation. Les plus âgés bénéficient quant eux de l'association de deux ou trois chimiothérapies. Le bortezomib, les immunomodulateurs (thalidomide, lenalidomide) et les corticoïdes constituent aujourd'hui les molécules de base de la plupart des associations. Ces derniers ont permis de révolutionner la survie des patients. Cependant, le myélome reste à ce jour une pathologie incurable. Actuellement, de nouvelles molécules sont en cours d'évaluation et suscitent de nombreux espoirs.

La connaissance et la compréhension de la maladie passe aussi par l'étude approfondie du microenvironnement tumoral appelé aussi stroma ou niche. En effet, celui-ci est un milieu complexe constitué d'un compartiment non cellulaire formant la matrice extracellulaire à laquelle adhèrent les cellules tumorales et d'un compartiment cellulaire où l'on des trouve des cellules hématopoïétiques (macrophages, lymphocytes) et non hématopoïétiques (cellules souches mésenchymateuses (MSCs), fibroblastes, ostéoblastes...). Le stroma tumoral est le siège d'un grand nombre d'interactions entre les plasmocytes tumoraux et les MSCs. Celles-ci se font de manière directe grâce à des molécules d'adhésion (VCAM, ICAM, LFA1, VLA4) ou indirecte via la sécrétion de diverses cytokines (IL-6, IGF- β , GDF-15...). Le dialogue entre ces deux populations cellulaires favorise la croissance, la dissémination tumorale, la néoangiogénèse mais aussi l'émergence de résistances aux traitements. Le



microenvironnement est ainsi un acteur essentiel dans la physiopathologie et l'étude de celui-ci est un enjeu important pour la compréhension de la maladie et le développement de nouvelles cibles thérapeutiques. Celle-ci passe notamment par la visualisation des MSCs grâce à des techniques d'imagerie métabolique *in-vivo*. Or, aucune méthode ne permet la visualisation de celui-ci à l'heure actuelle. L'imagerie nucléaire, méthode sensible, permet une détection quantitative d'un faible nombre de cellules. De plus, il s'agit d'une technique utilisée en clinique et donc facilement transposable pour une éventuelle utilisation chez l'homme. L'utilisation de celle-ci nécessite une accumulation spécifique d'un radioisotope au sein des MSCs. Ceci implique de les modifier génétiquement afin de les rendre capables de capter spécifiquement le radioisotope injecté. Le gène NIS (Sodium Iodide Symporter) est impliqué dans la captation de l'iode par les cellules thyroïdiennes. Il permet aussi la captation de ces isotopes radioactifs et peut donc être utilisé sur les MSCs. Des vecteurs viraux permettant de transcrire le transgène de façon stable et reproductible doivent être utilisés afin d'induire l'expression de NIS chez les MSCs.

Le but de ce travail était donc de mettre au point une méthode d'imagerie *in-vivo* du microenvironnement par TEMP/CT chez le petit animal. Celle-ci a été réalisée par radiomarquage des MSCs après modification génique de celles-ci afin de les rendre capables de séquestrer spécifiquement le radiotraceur injecté.



I. La lymphopoïèse B

Le plasmocyte est le stade terminal de la lymphopoïèse B. Il correspond, avec le lymphocyte B mémoire, à l'aboutissement d'un long processus de différenciation de cellules progénitrices immatures en cellules effectrices matures. Il constitue le support de la réponse immunitaire humorale spécifique par sa production et sa sécrétion d'immunoglobulines (Ig).

1) *Les molécules de la lignée lymphoïde B.*

Différentes molécules caractérisent l'ensemble des cellules de la lignée B et jouent des rôles variés.

Le B Cell Receptor (BCR) est un ensemble moléculaire essentiel dans la reconnaissance de l'antigène. Il est composé :

- D'une immunoglobuline (Ig).
- Des CD79a et CD79b aussi appelés Ig α /Ig β . Ce sont des phosphoprotéines dont la partie intracytoplasmique initie la transduction du signal lorsque l'antigène se fixe sur l'Ig. Celles-ci sont présentes à tous les stades de différenciation des lymphocytes B et chez tous les lymphocytes B matures (1).

Certaines molécules sont présentes à tous les stades de différenciation comme le CD19, et le CD22, molécules stabilisatrices du BCR, impliquées dans la transduction du signal et régulateur négatif du BCR (Figure 1).

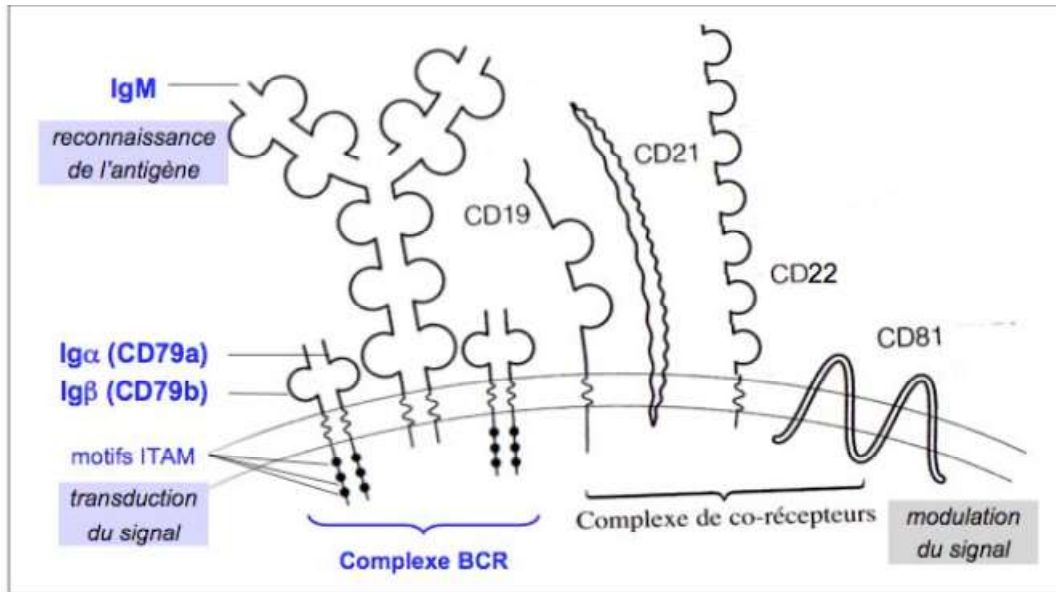


Figure 1 : Complexe moléculaire du BCR et autres molécules retrouvées à la surface des cellules B.

2) Phases intra-médullaires.

Le point de départ de la lymphopoïèse B est une cellule souche pluripotente commune aux différentes lignées lymphoïdes B, T et NK. Celle-ci se différencie en progéniteur lymphoïde B au sein de la moelle osseuse sous l'influence de cytokines comme les SCF (Stem Cell Factor) et l'IL-3. Cette cellule passe par différents stades de maturation dont chacun est caractérisé par l'apparition de nouvelles molécules. On retrouve ainsi successivement les lymphocytes pro B, pré B, B immature et B matures.

Le lymphocyte pro-B se caractérise par la synthèse d'une chaîne lourde μ d'Ig dans le cytoplasme. Ensuite, des réarrangements au niveau des gènes de ces chaînes lourdes surviennent. Deux chaînes μ recombinées se lient à deux pseudo chaînes légères ψ CL pour former le pré-BCR membranaire (Figure 2), caractéristique des cellules pré-B (3,4). Le pré-BCR ainsi formé se retrouve ensuite associée à des hétérodimères membranaires CD79a/CD79b. Il transmet ensuite un signal de survie aux cellules ayant réarrangé leurs chaînes lourdes pour les protéger de l'apoptose.

Les cellules ainsi générées présentent à leur surface une IgM intervenant dans la reconnaissance d'un antigène spécifique et un hétérodimère CD79a/CD79b contenant un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based activating motif) intervenant dans la transmission du signal immunitaire (1).

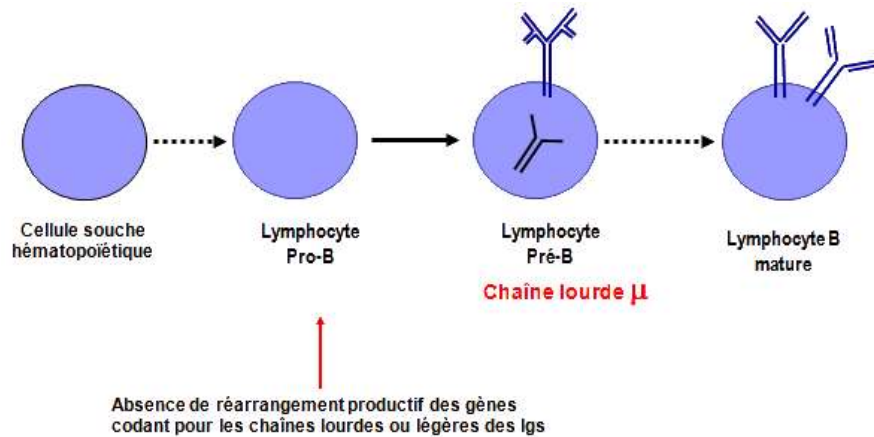


Figure 2 : Maturation intra-médullaire des précurseurs des lymphocytes B.

Les lymphocytes B entrent ensuite en contact avec des antigènes du soi. Ceux qui reconnaissent et réagissent avec ces antigènes sont inactivés permettant ainsi la tolérance immunitaire (6). Les autres, au contact des cellules stromales ainsi que sous l'influence de diverses cytokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6), acquièrent une IgD de surface et forment les lymphocytes B matures naïfs (1). D'autres marqueurs sont présents à des stades plus tardifs et ont des rôles plus spécifiques :

- CD20 : canal calcique présent uniquement chez les lymphocytes B matures.
- CD23 ou Fc ϵ R2. Il existe sous deux isoformes : CD23a, spécifique des cellules B et CD23b qui est une molécule inductible sur diverses cellules (B, T, NK, PE...).
- CD10 ou CALLA (Commun Acute Lymphoid Leukemia Antigen) : exprimée dans les stades immatures de l'immunopoïèse puis à nouveau dans les centres germinatifs.
- CD21 : régulateur des réponses prolifératives B, récepteur d'une fraction du complément.
- CD40 : exprimé en surface dès le stade pré-B. Son ligand CD40L est situé sur les lymphocytes T.
- Molécules HLA de classe II exprimées par toutes les cellules B. Elles interviennent dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T.

Au cours des différentes phases de maturation, on observe des variations phénotypiques avec notamment apparition ou disparition de diverses molécules. Certaines passent d'une expression cytoplasmique à une localisation membranaire (Figure 3).

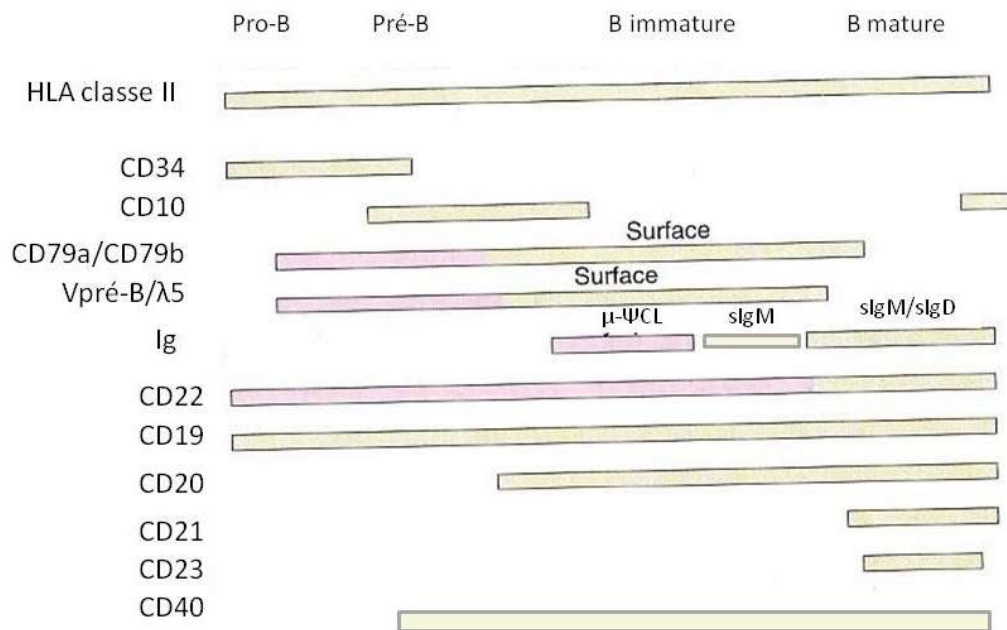


Figure 3 : Evolution du phénotype des lymphocytes B au cours de l'immunopoïèse. Rose : localisation cytoplasmique, beige : localisation membranaire.

3) Phases extra-médullaires.

Les lymphocytes B naïfs quittent la moelle osseuse vers la circulation sanguine puis lymphatique. Bien qu'ils n'aient jamais rencontré d'antigène (sauf ceux du soi), chacun porte sur sa surface une Ig complémentaire d'un antigène précis. Ces lymphocytes circulent dans l'organisme jusqu'à ce que l'un d'entre eux rencontre l'antigène complémentaire.

La rencontre d'un lymphocyte B naïf avec l'antigène peut se faire dans un tissu. Le lymphocyte migre ensuite vers l'organe lymphoïde le plus proche. Elle peut aussi se faire au niveau d'un organe lymphoïde périphérique (ganglion lymphatique). Dans ce cas, l'antigène est apporté et présenté au lymphocyte par un macrophage. Le complexe antigène-Ig ainsi formé est endocyté et subit des modifications biochimiques ainsi qu'un couplage aux molécules du CMH. Puis, l'antigène ou les fragments de celui-ci sont réexprimés en surface du lymphocyte B.

L'activation du BCR est modulée par des cofacteurs activateurs (CD19/CD81/CD21) ou inhibiteurs (CD22/CD72).

Les lymphocytes B ainsi stimulés vont proliférer dans une région T du ganglion et entrer en contact avec un lymphocyte T CD4 spécifique du même antigène. Les interactions entre les deux lymphocytes impliquent plusieurs couples de ligand/récepteur et une présentation de l'antigène au TCR du lymphocyte T par le lymphocyte B (Figure 4). Ainsi, l'activation

complète des lymphocytes B nécessite une coopération avec les lymphocytes T CD4 et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (1).

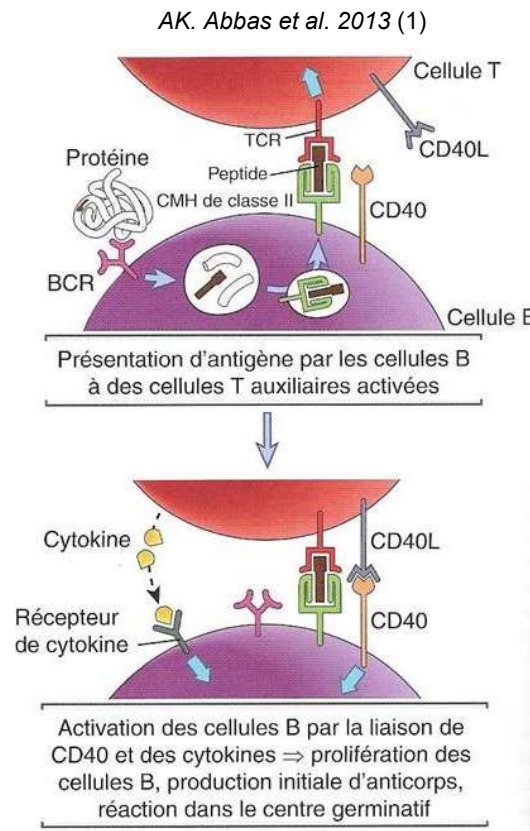


Figure 4 : Interaction entre un lymphocyte T CD4 et un lymphocyte B naïf.

Parmi les cellules B activées, certaines sécrètent une IgM de faible affinité afin d'assurer la réponse immune primaire rapide tandis que d'autres migrent vers une région du ganglion appelée follicule primaire. Si la réponse immune se poursuit, les cellules continuent à y proliférer transformant le follicule primaire en follicule secondaire avec un centre germinatif (zone sombre) (1). Les lymphocytes qui y résident sont appelés les centroblastes.

Cette région du ganglion sera le siège d'une intense prolifération et de phénomènes de mutations somatiques des gènes codants pour les immunoglobulines. Ces réarrangements sont associés à un arrêt de la transcription de ces gènes et les lymphocytes B n'expriment plus d'Ig de surface.

Les centroblastes migrent ensuite hors des centres germinatifs vers la zone claire pour se différencier en centrocytes exprimant de nouvelles Ig de surface qui reconnaissent le même antigène mais avec plus d'affinité. L'antigène leur est à nouveau présenté par des CPA. Les lymphocytes portant une Ig d'affinité élevée pour l'antigène survivent. En revanche, ceux portant une Ig de faible affinité sont éliminés par apoptose (Figure 5). Ce processus permet ainsi de sélectionner des cellules avec une Ig de forte affinité pour l'antigène.

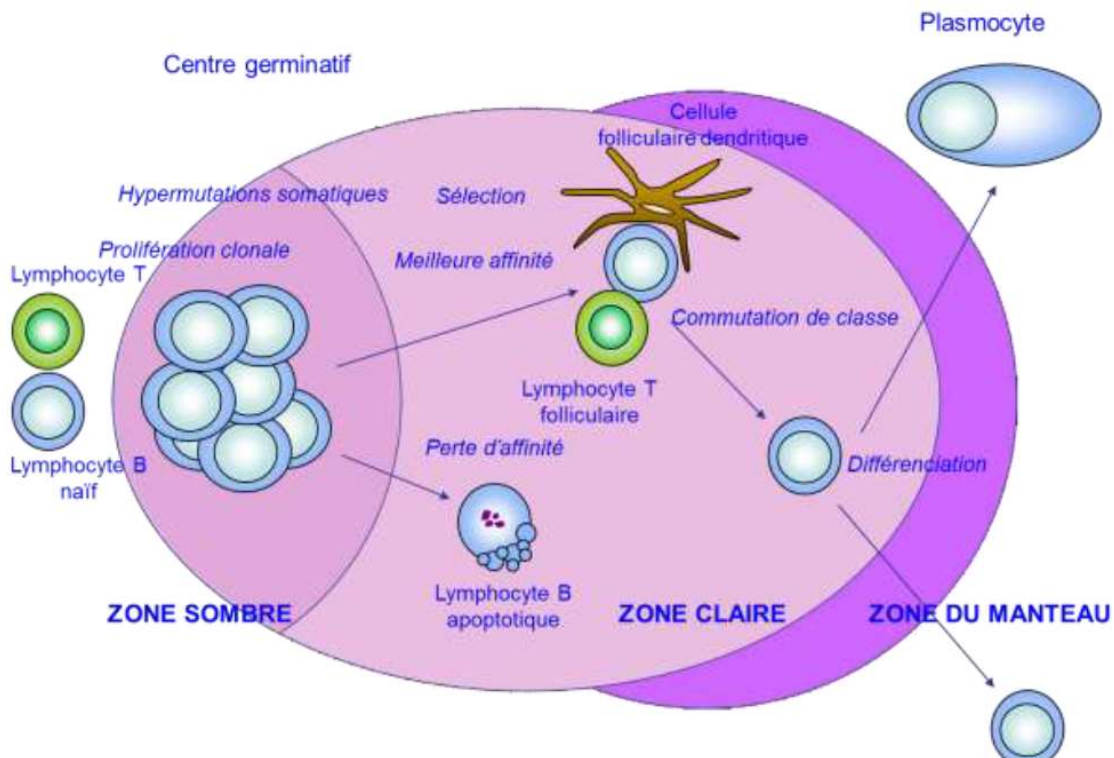


Figure 5 : Maturation et sélection des lymphocytes B au sein des ganglions lymphatiques.

Parmi les cellules sélectionnées, certaines vont se différencier en lymphocytes B mémoire qui circulent indéfiniment dans l'organisme à la recherche de leur antigène complémentaire. Un nouveau contact induit un nouveau cycle d'immunopoïèse qui produira de nouvelles cellules B encore plus spécifiques de l'antigène. Les lymphocytes mémoires possèdent un BCR de forte affinité pour l'antigène par rapport aux lymphocytes naïfs. Une autre partie se différencie pour donner des cellules plasmocytaires. Celles-ci, encore immatures, se multiplient de façon importante et sont appelées les plasmoblastes. Certaines d'entre elles migrent vers la moelle osseuse ou la lamina propria du tube digestif pour donner les plasmocytes matures. La maturation des plasmocytes s'accompagne de l'expression de marqueurs spécifiques : CD38 et CD138.

4) Morphologie des plasmocytes.

Les plasmocytes représentent l'un des stades terminal de la lymphopoïèse B et sont les cellules effectrices de l'immunité humorale (1). Ils sont présents en très faible quantité dans la moelle osseuse (1 à 3% des cellules nucléées) et quasiment absents de la circulation sanguine.

L'observation par coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG) de frottis médullaires (Figure 6) montre des cellules d'aspect ovalaire, de tailles variables (20 à 30µm pour le grand axe et 10 à 15 µm pour le petit axe), avec un petit noyau excentré (rapport nucléocytoplasmique

d'environ 0.3) et une chromatine densément mottée. Le cytoplasme est basophile car très riche en ARN et présente près du noyau une zone claire appelée archoplasme (appareil de Golgi).

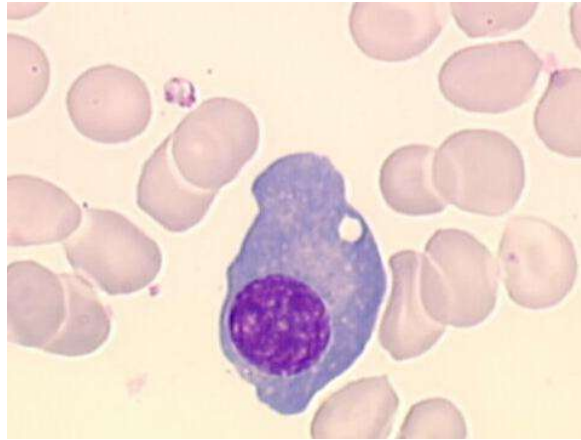


Figure 6 : Observation par coloration au MGG de plasmocyte issu de frottis médullaires.

II. Les immunoglobulines.

Les immunoglobulines désignent une super-famille de glycoprotéines membranaires ou solubles ayant une activité anticorps. Elles sont spécialisées notamment dans des fonctions de reconnaissance (TCR), de liaison et d'interaction cellule-cellule (CD4, CD8, CD19...).

1) *Structure générale des anticorps.*

Malgré leur grande diversité, les immunoglobulines présentent une structure de base semblable avec 2 chaînes lourdes (H : heavy) de 50 à 70 kDa et 2 chaînes légères (L : light) d'environ 25 kDa. Celles-ci sont réunies par des ponts disulfures formés par des résidus cystéine. Chaque chaîne est constituée d'une région constante C et d'une région variable V. Les fragments V contiennent l'activité de liaison à un antigène. Ainsi, l'assemblage des régions V des chaînes lourdes et légères définit le site de liaison à l'antigène. Le clivage par l'enzyme papaïne donne un fragment $F(ab')_2$ formé des régions V_H-C_{H1} et V_L-C_L et un fragment F_c (fragment cristallisable). La fraction $F(ab')_2$ contient le site de liaison à l'antigène (fragment Fab) et la fraction F_c est responsable des fonctions effectrices (liaison au complément, liaison aux monocytes, macrophages, lymphocytes...) (Figure 7) (6).

Il existe 5 types de chaînes lourdes (α , γ , μ , δ et ϵ) auxquels correspondent 5 classes d'Ig (IgA, IgG, IgM, IgD et IgE) avec 4 sous-types de chaînes γ (γ_1 à γ_4) et 2 sous-types de chaînes α (α_1 et α_2).

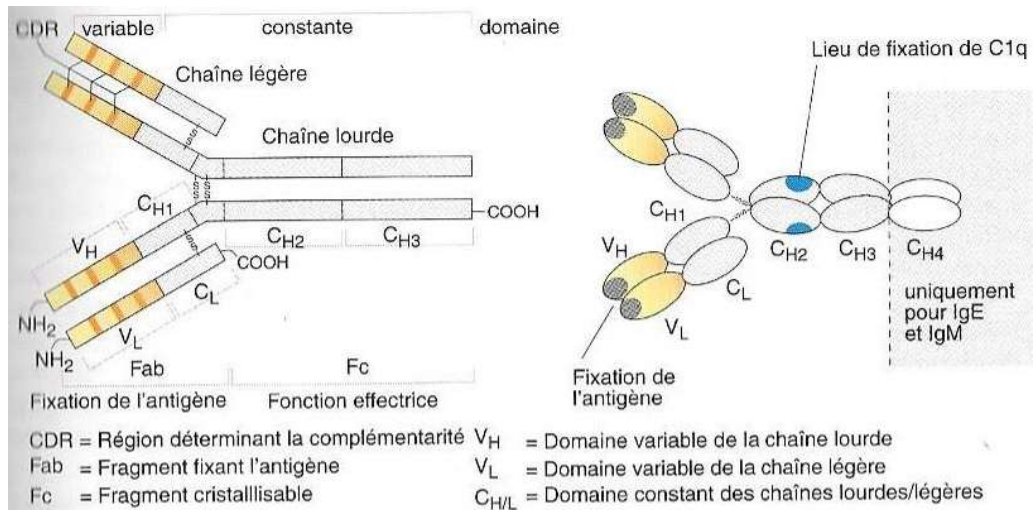


Figure 7 : Structure générale d'une Ig avec les fractions anticorps (Fab) et cristallisables (Fc) et indication des chaînes légères (L) et lourdes (H). Les régions variables sont notées V_H pour les chaînes lourdes et V_L pour les chaînes légères ; les régions constantes sont notées C_H pour les chaînes lourdes et C_L pour les chaînes légères.

On distingue 2 types de chaînes légères appelés κ et λ. Celles-ci peuvent se combiner avec n'importe quelle chaîne lourde. Une Ig a obligatoirement deux chaînes légères et deux chaînes lourdes du même type (6).

Chaque chaîne comporte des ponts disulfures intrachaînes dont le nombre varie selon la classe.

2) Les différentes classes d'immunoglobulines.

Il existe cinq classes d'immunoglobulines basées sur la structure des chaînes lourdes : IgA, IgG, IgD, IgE, IgM) (Figure 8).

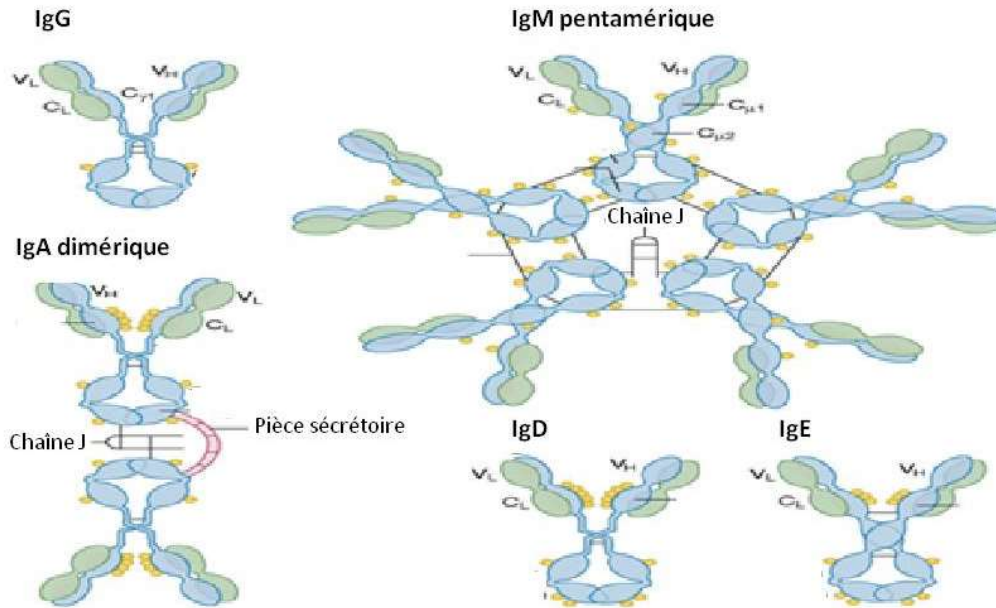


Figure 8 : Structures générales des différentes classes d'immunoglobulines

Les IgG sont les Ig majoritaires dans le sérum (85%) et sont produites en grande quantité lors des réponses immunitaires secondaires. Ce sont les plus petites avec un poids moléculaire d'environ 150kDa et sont toujours monomériques. On compte quatre types d'IgG (IgG1 à IgG4). De plus, ce sont les seules Ig à traverser la barrière placentaire et elles se fixent au complément.

Les IgA sont divisées en 2 sous classes : IgA1 (majoritaire) et IgA2. Elles sont retrouvées dans le sang où elles représentent la deuxième classe d'Ig et les sécrétions (salive, lait, urine, sécrétions bronchique et gastro-intestinales). Dans le sang, elles se retrouvent essentiellement sous forme monomérique et plus rarement sous forme di ou trimérique. Au niveau des sécrétions, elles sont surtout sous forme dimérique. Les monomères sont liés entre eux par une chaîne de jonction J via des ponts disulfures. Une pièce sécrétoire S est liée aux monomères de l'IgA et permet leur liaison à la surface des cellules épithéliales des muqueuses puis leur translocation dans la lumière par exocytose.

Les IgM existent sous forme monomérique à la surface des lymphocytes B et sous forme pentamérique dans le sang et les sécrétions. Il s'agit de la première classe d'Ig produite par les cellules B au cours de leur maturation et lors des stades précoces de la réponse immunitaire. Leur affinité pour l'antigène est plus faible que pour les autres Ig (8). Elles permettent l'activation de la voie classique du complément.

Les IgE sont présentes à de très faibles concentrations dans le sérum et se lient avec une forte affinité à la surface des polynucléaires éosinophiles et des mastocytes. Le pontage de

deux IgE par un antigène à la surface d'un mastocyte entraîne leur dégranulation et la libération de médiateurs comme l'histamine qui sont impliqués dans les réactions d'hypersensibilité.

Les IgD existent en très faible quantité dans le sérum. On les retrouve seulement à la surface des lymphocytes B où elles sont associées à des IgM. Leurs propriétés sont mal connues. Elles bloqueraient les cellules B autoréactives au cours du développement.

3) Génétique de la structure des immunoglobulines.

Les Ig sont codées par trois groupes de gènes localisés sur des chromosomes différents auquel il faut ajouter ceux de la chaîne J et de la pièce sécrétoire. La grande diversité des Ig ne provient que d'un nombre limité de gènes. Au cours de la lymphopoïèse B et de l'immunopoïèse, ces 3 gènes vont subir trois types de modifications.

1. Recombinaisons génétiques au cours de la lymphopoïèse.

La recombinaison génétique est une étape indispensable pour permettre l'expression du caractère lymphoïde B. Elle consiste à transformer des gènes longs et non fonctionnels en gènes plus courts et capable de coder pour les chaînes lourdes et légères.

i. Organisation des gènes des immunoglobulines.

Les gènes de la chaîne lourde sont situés sur le bras long du chromosome 14 (14q32). On trouve 4 groupes de gènes dont 3 codant pour la région variable et 1 pour la partie constante C.

Le génome responsable de la partie variable des chaînes lourdes VH comprend 3 groupes de gènes : V (variable), D (diversité) et J (jonction). Chaque gène est précédé d'une séquence L (leader) (Figure 9).

Les gènes codant pour la chaîne κ sont situés sur le chromosome 2 et ceux codant pour la chaîne λ sont sur le chromosome 22. Leur succession est semblable à celle des chaînes lourdes avec des gènes V et J mais sans gène D. De plus, le chromosome 22 possède en plus deux gènes (Vpré-B et $\lambda 5$) codant pour des protéines semblables aux chaînes légères (pseudo chaînes légères ψ CL) présentes au stade pré-B (6).



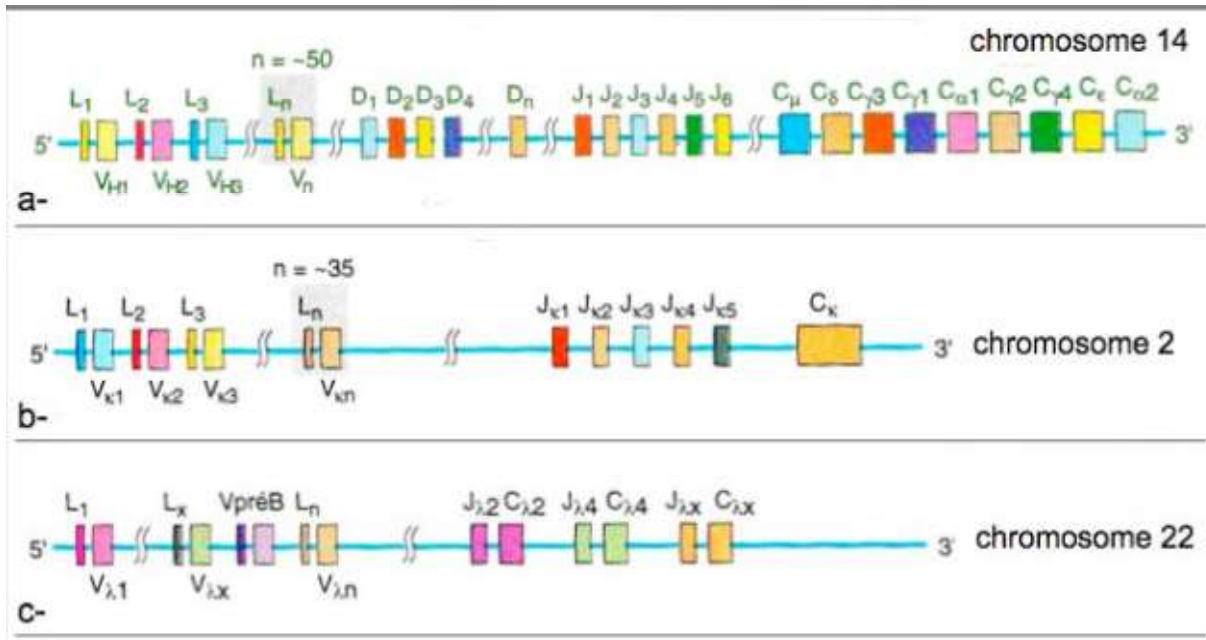


Figure 9 : Organisation des gènes codant pour les Ig (a) les chaînes lourdes, (b) les chaînes légères λ (c) les chaînes légères κ.

ii. Réarrangement des gènes des chaînes lourdes.

Au cours des stades pro-B et pré-B, des boucles se forment au hasard au sein des gènes des chaînes lourdes rapprochant ainsi des segments lointains. Ces réarrangements se font en premier lieu au sein du chromosome 14 où un gène D se retrouve joint à un segment J. La partie d'ADN intermédiaire est délétée. Dans un second temps, le même mécanisme permet le rapprochement d'un gène V au gène réarrangé DJ. La transcription puis la traduction de ce nouveau gène VDJ conjointement avec C permet la synthèse d'une protéine VDJC qui, après maturation et élimination de la séquence L, forme la chaîne lourde Hμ. La combinaison de deux chaînes lourdes avec deux pseudo chaînes légères ψCL forment le pré-BCR à la surface des lymphocytes pré-B (Figure 10) (6). L'expression du pré-BCR à la surface des lymphocytes pré-B marque le début de la recombinaison des chaînes légères.

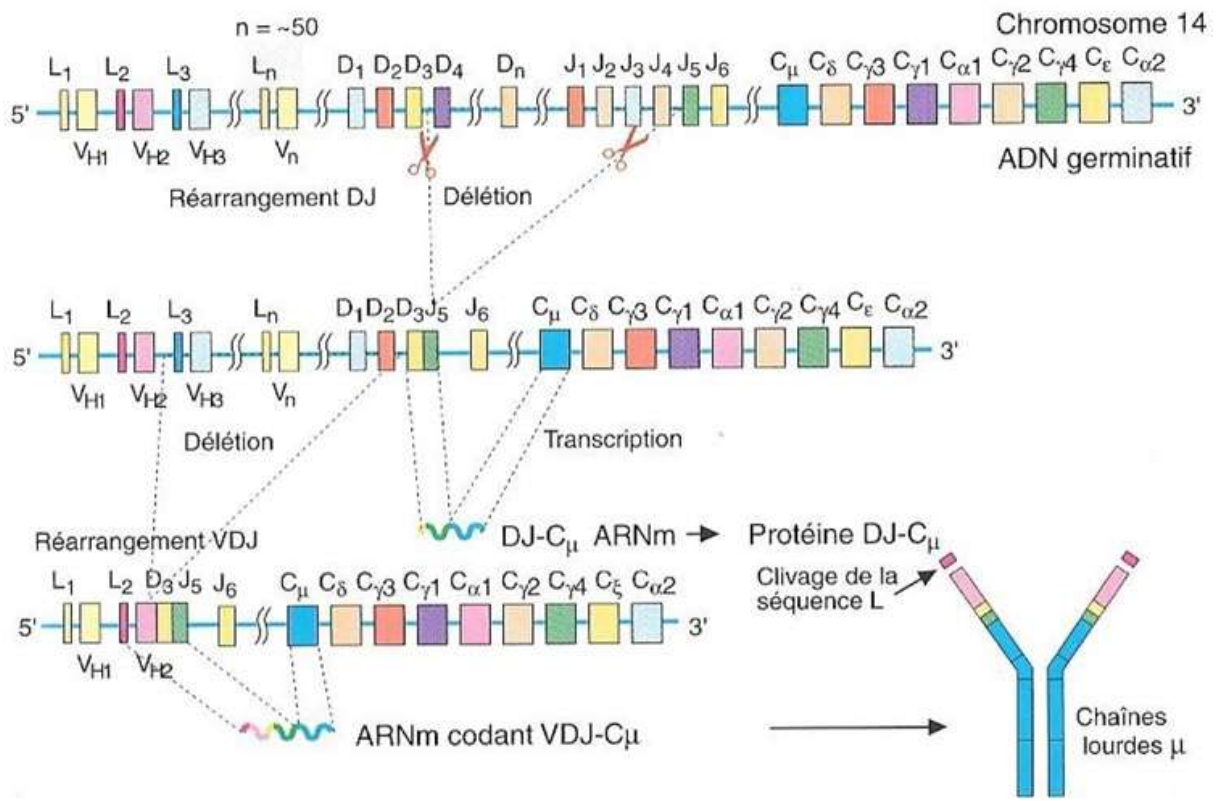


Figure 10 : Réarrangement des gènes des chaînes lourdes d'Ig et formation du pré BCR.

iii. Recombinaison des gènes des chaînes légères.

Le réarrangement des chaînes légères se déroule selon le même principe mais en une seule étape puisqu'il n'y a pas de gène D. On retrouve ainsi la formation du gène VJ qui sera transcrit puis traduit conjointement avec le gène des parties constantes C_λ ou C_κ. La recombinaison implique d'abord les gènes des chaînes κ du chromosome 2. En l'absence de réarrangement sur le chromosome 2, la cellule procède alors à celui des gènes des chaînes λ du chromosome 22. Lorsqu'un réarrangement a lieu sur l'un des deux chromosomes, il ne peut y en avoir sur le second. Chaque cellule produit donc un seul type de chaîne légère (6).

iv. Exclusion allélique.

L'ensemble de ces remaniements génique est associé à un phénomène d'exclusion allélique qui interdit à la cellule concernée d'exprimer une double spécificité antigénique. Ainsi, chaque lymphocyte émergeant dans le sang porte la signature d'un seul récepteur antigénique de même que tous ses descendants (8).

L'ensemble de ces remaniements permet de générer un répertoire aléatoire et varié de spécificités antigéniques dont certaines seront sélectionnées et amplifiées en réponse à une stimulation antigénique. En effet, les recombinaisons varient d'une cellule à l'autre

aboutissant à des milliers de séquences différentes pour la partie variable. Les lymphocytes B naïfs générés portent tous une IgM de surface différente grâce à un mécanisme indépendant de toute stimulation antigénique.

2. Mutation somatique et commutation isotypique.

Dans le ganglion lymphatique, lorsqu'un lymphocyte B naïf rencontre l'antigène complémentaire de la région Fab de son IgM de surface, deux modifications des gènes d'Ig vont se produire successivement : les mutations somatiques et le switch de classe d'Ig ou commutation isotypique.

i. Mutation somatique.

Les mutations somatiques sont des phénomènes aléatoires survenant au niveau des régions variables (segments VDJ et VJ) des gènes des Ig. Ces mutations portent seulement sur quelques codons et ont pour effet de d'améliorer l'affinité des Ig pour l'antigène (8).

ii. Commutation isotypique.

La région constante des chaînes lourdes est codée par 9 gènes : μ , γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α_1 , α_2 , δ et ϵ . Les cellules B en cours de maturation produisent tout d'abord des IgM. Les séquences réarrangées se joignent au gène $C\mu$ pour former une chaîne lourde.

Chaque gène C est précédé d'une séquence S (switch). Cette séquence contrôle leur réarrangement en formant des hybrides avec d'autres séquences S. Il se produit un rapprochement entre la région switch de $C\mu$ et une autre région S en aval sur le gène de l'Ig par formation d'une boucle. La région entre ces deux séquences est ensuite excisée. Il en résulte la délétion de la région $C\mu$ et le rapprochement entre le segment VDJ et une autre région C qui peut être $C\gamma$, $C\alpha$ ou $C\epsilon$. Le rapprochement de l'une de ces séquences à la région VDJ induit la synthèse d'une Ig ayant une région variable proche de l'IgM ayant reconnu l'antigène mais avec une partie constante d'isotype G, A ou E (Figure 11).

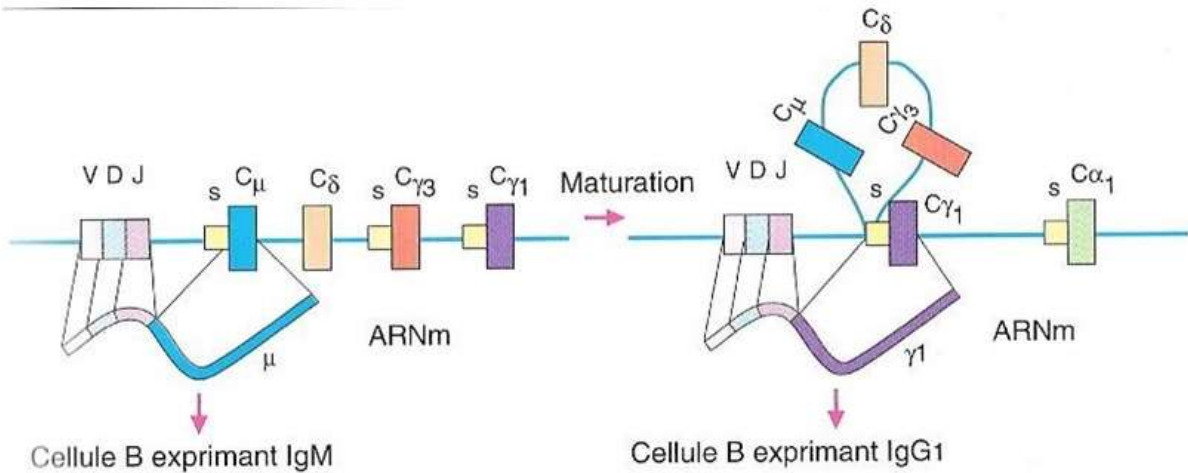


Figure 11 : Commutation isotypique des Ig. Exemple de formation des IgG1.

L'ensemble de ces 2 mutations aboutit à la production d'Ig de forte affinité pour l'antigène spécifique, effecteurs de l'immunité secondaire (6).

Chaque plasmocyte issu de la lymphopoïèse possède une combinaison génétique propre, fonction de l'isotype et de la spécificité de l'Ig produite.

I. Pathologie tumorale

1) *Définition.*

Le myélome multiple (MM) ou Maladie de Kahler est une hémopathie maligne caractérisée par le développement d'un clone tumoral de cellules lymphoïdes B menant à une accumulation de plasmocytes. Cette accumulation se concentre essentiellement au sein de la moelle osseuse formant les plasmocytomes mais il existe des localisations extramédullaires. L'expansion des plasmocytes tumoraux s'accompagne d'une sécrétion Ig monoclonales (complètes ou non), appelée paraprotéine ou protéine M. Ces dernières sont détectables dans le sérum et/ou dans les urines.

La prolifération et l'infiltration plasmocytaire dans la moelle osseuse amène à terme à des manifestations cliniques pouvant être graves pour le patient. Le développement de ces symptômes requiert donc une prise en charge thérapeutique rapide.

Le diagnostic de la maladie repose sur l'association d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques.

2) *Epidémiologie.*

Le myélome est la deuxième hémopathie maligne derrière le lymphome. En effet, il représente 10 à 13% de l'ensemble des hémopathies malignes et 20% des décès liés aux tumeurs hématopoïétiques. En France, environ 3500 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. Il s'agit d'une maladie touchant essentiellement les sujets âgés puisque l'incidence augmente avec l'âge. L'âge médian au moment du diagnostic est de 70 ans chez les hommes et 74 ans chez les femmes. De plus, les hommes sont légèrement plus touchés que les femmes (54% contre 46%) (9).

3) *Physiopathologie*

L'apparition du myélome proprement dit est le résultat d'une succession d'étapes bien définies. En effet, la première étape de l'oncogenèse implique un stade prémyélomateux indolent nommé (Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance) (MGUS) évoluant ensuite vers un stade dit myélome « fumant » (Smoldering Multiple Myeloma) ou asymptomatique. La dernière étape constitue le stade Myélome, c'est-à-dire la phase symptomatique.

1. Origine du Myélome Multiple.

La cellule à l'origine de la maladie reste encore mal connue. L'analyse des gènes des régions variables des chaînes lourdes (V_H) et légères (V_L) montre que les cellules constituant le clone malin présentent une recombinaison VDJ identique ainsi que les mêmes mutations de V_H et V_L (10,11). Ceci montre l'origine lymphoïde post-folliculaire des cellules du myélome.

La cellule à l'origine du MM présente une ou plusieurs anomalies génotypiques mais elle conserve ses capacités de migration et de différenciation en plasmocytes tumoraux sécrétant une Ig. Une étude a montré qu'il existait, chez un même patient, des populations de cellules myélomateuses à différents degrés de maturité (12). La fraction la plus immature, correspondant aux cellules capables de proliférer et d'autorenouvellement, serait responsable de l'expansion du clone tumoral. Ainsi, le MM correspondrait à une accumulation de plasmocytes tumoraux directement issus de plasmoblastes tumoraux immatures (13).

Il est probable qu'une instabilité génétique soit responsable du développement du clone tumoral. Celle-ci surviendrait au cours des modifications successives de l'ADN subies par les cellules B lors de leur maturation (recombinaison VDJ, commutation isotypique, hypermutation somatique). Ces erreurs conduisent à des réarrangements chromosomiques aboutissant à une activité cellulaire anormale traduisant la malignité. Ainsi, le MM pourrait apparaître à la suite d'une stimulation antigénique au sein des centres germinatifs avec sélection, expansion et progression d'un clone anormal.

2. Cytogénétique et altérations moléculaires.

L'étude génétique des cellules myélomateuses est difficile en raison du faible taux de prolifération de la majorité des cellules retrouvées dans le MM. Les prélèvements de moelle osseuse étudiés contiennent ainsi un mélange de cellules myéloïdes normales et de plasmocytes tumoraux. Cependant, l'étude cytogénétique du MM par Hybridation par Fluorescence In Situ (Fluorescence Hybridation *In-Situ* : FISH) révèle une anomalie chez 90% des patients (14). Ces événements précoces participent à la pathogénèse.

Il n'existe pas d'anomalie génétique spécifique du MM mais plusieurs sous-groupes se retrouvent fréquemment. C'est le cas notamment des réarrangements du chromosome 14 (14q32) portant sur les gènes codant pour la chaîne lourde des Ig. En effet, celle-ci est retrouvée chez 50 à 70% des patients (15–17). Les autres aberrations fréquemment rencontrées sont les hyperdiploïdies (47 à 60 chromosomes voire 75 chromosomes) dans 40 à 50% des cas (14), la délétion du chromosome 13 (40 à 50% des cas), un gain de copie du

chromosome 1 (30 à 40% des patients) et une perte du bras court du chromosome 17 chez environ 10% des patients (14,15). Les chromosomes impliqués dans les hyperdiploïdies sont souvent les chromosomes n°3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21 (15). Des translocations portant sur les gènes des chaînes légères des Ig sont aussi retrouvées mais dans de plus faibles proportions. Ainsi, des réarrangements du chromosome portant le gène IgL-λ (22q11) sont retrouvés dans 20% des cas. La translocation impliquant le gène IgL-κ (2p11) n'est recensée que dans 2 à 3% des cas. (15,16). Les réarrangements du chromosome 14 peuvent occasionner l'activation de certains oncogènes comme le CCND1 avec la translocation t(11 ;14) chez 20% des patients, le FGFR3 et MMSET pour t(14 ;16) dans 15% des cas et le c-MAF chez 3% des patients (18). La délétion du bras court du chromosome 13 entraîne quant à elle une perte du gène suppresseur de tumeur p53 (19).

3. Oncogenèse : un processus multi-étapes.

Le MM serait le résultat d'un processus impliquant une succession de mutations génétiques impliquant des chromosomes bien définis (Figure 12).

L'apparition du stade MGUS a aussi une origine génétique et fait intervenir la translocation (14q32). En effet, on s'aperçoit que 50% des patients présentent une translocation du chromosome 14 à ce stade (17). Trois types de réarrangements du chromosome sont retrouvés majoritairement : t(4 ;14), t(11 ;14) et t(14 ;16). L'incidence des anomalies caryotypiques augmente au fur et à mesure de la maladie.

La progression du stade MGUS vers le myélome multiple fait elle aussi appel à une succession de mutations (20). La délétion du chromosome 13 est retrouvée dans tous les stades de la maladie. Cependant, il a été observé que son incidence augmentait lors de la progression vers la phase symptomatique. En effet, celle-ci est observée dans 22% des patients avec un MGUS tandis qu'elle est retrouvée dans 43% des patients atteints d'un myélome multiple. Ainsi, la survenue d'une délétion au niveau du chromosome 13 favoriserait la progression vers la phase symptomatique chez les patients ayant un MGUS (21). C'est aussi le cas du gain du bras long du chromosome 1 et de la délétion p17 dont l'incidence augmente au fur et à mesure que la maladie progresse (18). D'autres mutations impliquant plusieurs gènes comme le p53, RAS, Rb, myc ou bcl2 sont impliquées dans le passage au stade myélome (22). La perte ou la surexpression de ces gènes favorisent l'activation des plasmocytes.

D'après SV. Rajkumar et al. 2005

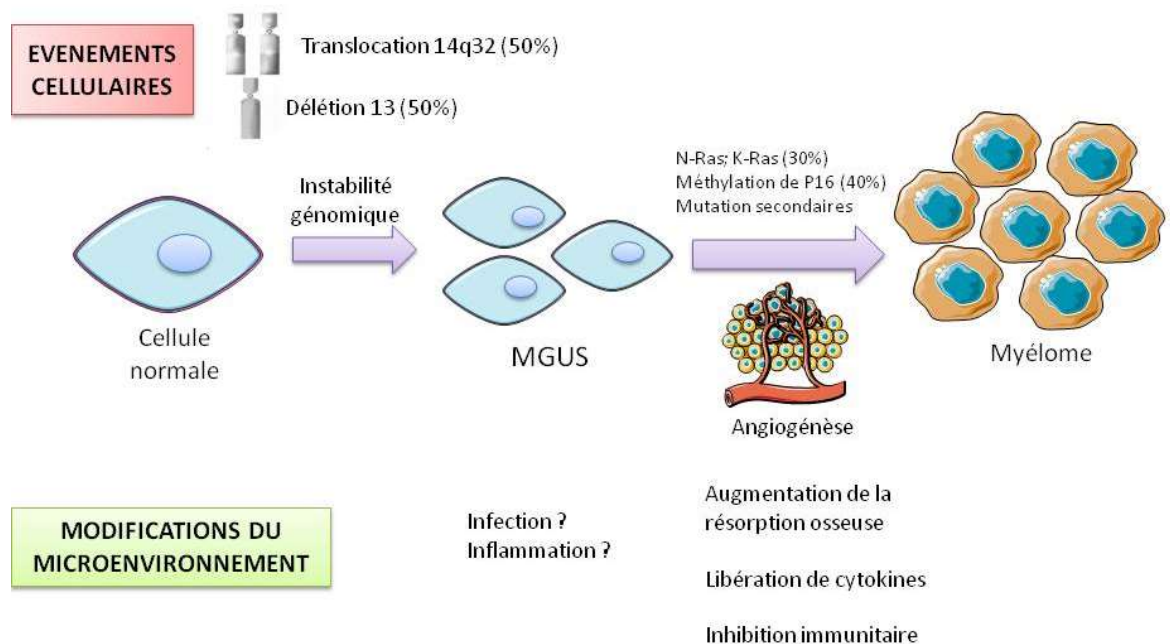


Figure 12: Différentes étapes de l'oncogenèse du myélome multiple.

4) **Complications : physiopathologie et conséquences cliniques.**

Grâce à une meilleure connaissance de la maladie, le diagnostic de MM peut être établi plus précocement (au moins 20% des cas) chez un patient asymptomatique (MGUS) lors d'un bilan d'exploration d'une augmentation de la vitesse de sédimentation (VS) ou d'une anomalie lors d'une électrophorèse des protéines sériques. Lorsque le MM devient symptomatique, il peut être diagnostiqué sur des signes cliniques non spécifiques tels qu'une altération de l'état général. Le MM se manifeste aussi par des symptômes plus spécifiques notamment osseux et rénaux.

1. Douleurs osseuses.

Les symptômes osseux font partie des signes caractéristiques de la maladie et sont l'un des facteurs de morbidité les plus importants. Des anomalies osseuses sont retrouvées dans 70 à 80% des cas (23,24). Ils sont le résultat de lésions ostéolytiques importantes (géodes) qui peuvent aboutir à des fractures pathologiques qui constituent souvent le signe évocateur de la maladie. Celles-ci peuvent se retrouver sur tout le squelette mais se localisent principalement là où l'hématopoïèse est la plus active à savoir le rachis, les côtes, le sternum, le crâne et les extrémités proximales des fémurs et humérus.

Ces anomalies font suite à un déséquilibre entre la formation et la résorption osseuse. En effet, on observe une augmentation de l'activation ostéoclastique médiée par les

plasmocytes tumoraux au détriment de l'activité ostéoblastique. Ces derniers sont responsables d'une dérégulation du système RANK/RANKL qui joue un rôle essentiel dans l'activation et la différenciation ostéoclastique (25). Le récepteur RANK appartient à la famille des récepteurs au TNF α et se trouve à la surface des ostéoclastes et de ses précurseurs. L'agoniste du récepteur est le RANK-ligand (RANKL), protéine synthétisée et libérée par les ostéoblastes et certaines cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T. L'activation de RANK par son agoniste permet donc une activation ostéoclastique via la voie NF- κ B. L'ostéoprotégérine (OPG) est une protéine soluble libérée par les ostéoblastes qui joue le rôle de récepteur piège au RANKL et inhibe l'activation ostéoclastique. Il existe donc un équilibre de l'activité ostéoclastique via le système RANK/RANKL et l'OPG. Cet équilibre est perturbé par les plasmocytes tumoraux qui stimulent la libération de RANKL par les ostéoblastes (26) et piègent l'OPG par liaison au CD138 et internalisation (27) diminuant ainsi son taux plasmatique durant la progression de la maladie (28). D'autres cytokines sont impliquées dans l'augmentation de la résorption osseuse comme l'IL-6, l'IL-1, l'IL-3, le CCL-3 (appelée aussi MIP-1 α) ou le CCL-20 (29) (Figure 13).

M. Macro et al. 2011 (30)

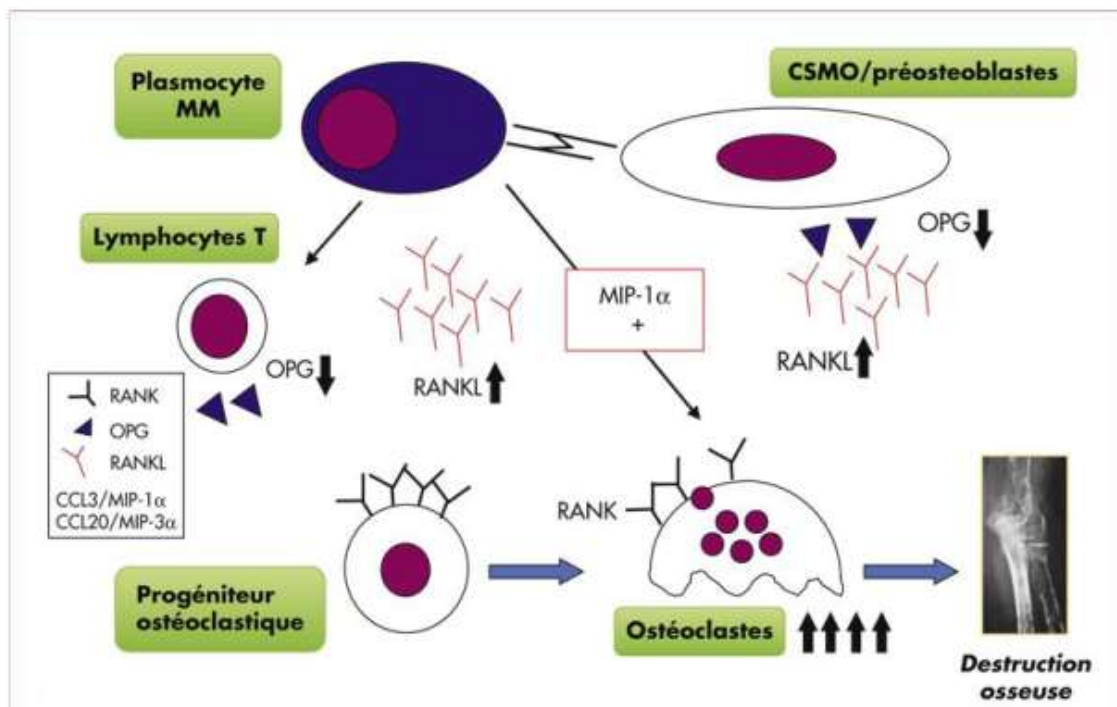


Figure 13 : Physiopathologie de l'activation ostéoclastique.

2. Hypercalcémie.

L'augmentation de la résorption osseuse observée provoque un relargage de substance minérale dans le sang et notamment de calcium. Cette libération accrue de calcium est la cause principale de l'hypercalcémie retrouvée dans le MM.

Cette augmentation du calcium va être à l'origine de nombreux troubles cliniques et fonctionnels en particulier neurologiques, cardio-vasculaires, digestifs et métaboliques. Son augmentation constitue un élément de gravité et parfois une urgence thérapeutique.

3. Troubles rénaux.

L'altération de la fonction rénale est une des complications les plus fréquentes. Cette altération débouchant à une insuffisance rénale altère fortement la survie des patients. Plusieurs mécanismes interviennent dans la survenue de ces complications.

La néphropathie à cylindres myélomateux ou tubulopathie myélomateuse est de loin la plus fréquente des altérations rénales (environ 80%). Elle est liée à la présence de cylindres urinaires formés de chaînes légères d'immunoglobulines monoclonales et de glycoprotéines de Tamm-Horsfall. Ces dernières sont sécrétées par les cellules du tube contourné proximal et coprécipitent avec les chaînes légères au niveau du tube contourné distal lorsqu'elles sont présentes en trop grande quantité (31). Ces agrégations sont à l'origine de l'obstruction intraluminale du rein puis de l'insuffisance rénale aiguë ou chronique observées chez les patients.

La néphropathie des dépôts se manifeste par des dépôts tissulaires ou extratissulaires de chaînes légères d'immunoglobulines monoclonales (kappa plus souvent que lambda) ou de fragments de chaînes (amylose AL). Ces dépôts s'organisent sous forme de feuillets beta plissés pour former des fibrilles. L'amylose représente moins de 20% des complications rénales. On retrouve aussi dans de rares cas des dépôts de chaînes légères isolées ou plus rarement de chaînes lourdes non organisés en feuillet (maladie de Randall). Ces altérations sont majorées lors des hypercalcémies (précipitation des sels de calcium), de déshydratation, d'infection ou de prises de certains médicaments néphrotoxiques (produits de contrastes iodés).

Le syndrome de Fanconi associé au myélome est une complication rare. Il se caractérise par un dysfonctionnement tubulaire proximal secondaire à une accumulation intracytoplasmique de cristaux de chaînes légères. Celle-ci entraîne des troubles de la réabsorption du potassium, du phosphore, des bicarbonates, du glucose, de l'acide urique menant à une acidose métabolique ainsi qu'à de nombreux troubles électrolytiques (32).



4. Anémie.

L'anémie est retrouvée chez plus de 65% des patients au moment du diagnostic (23,24,33). Elle fait suite à un phénomène d'envahissement médullaire par les plasmocytes tumoraux conjugué à la sécrétion de cytokines proinflammatoires (IGF- β , TNF- α) inhibant l'érythropoïèse. En effet, les plasmocytes tumoraux inhibent la maturation des précurseurs de la lignée érythrocytaire via une action proapoptotique. Cette induction de l'apoptose chez les érythroblastes se fait grâce à une forte expression du FasL et/ou de TRAIL par les plasmocytes (34).

De plus, les atteintes rénales avec baisse de synthèse de l'érythropoïétine ainsi que le syndrome inflammatoire accentuent ce phénomène.

5. Infections à répétitions.

La sensibilité des patients aux infections constitue un facteur de morbi-mortalité important. Il s'explique par l'envahissement médullaire par les plasmocytes tumoraux qui perturbent les fonctions immunitaires normales. En effet, on observe une inhibition de la lymphopoïèse B entraînant une diminution de la synthèse des immunoglobulines polyclonales. Cette hypogammaglobulinémie s'accompagne d'une inhibition de la fonction T ainsi que d'une activation aberrante des macrophages.

L'ensemble de ces phénomènes rend les patients sensibles aux virus (zona, herpès) ainsi qu'aux germes encapsulés (pneumocoques, haemophilus) provoquant des infections respiratoires mais aussi des septicémies. Cette sensibilité est amplifiée lors de l'usage des chimiothérapies.

6. Syndrome d'hyperviscosité.

Lorsque le taux d'immunoglobulines sécrétées dans le sang est important, l'hyperprotidémie qui en découle peut être responsable des phénomènes d'hyperviscosité liés à l'importance du pic monoclonal. Ceux-ci sont rarement observés mais peuvent nécessiter un traitement en urgence par plasmaphérèse.

Ils se manifestent par des signes oculaires avec baisse de l'acuité visuelle ainsi que des signes neuropsychiques avec vertiges, céphalées, acouphènes, syndrome confusionnel voire coma ou acroparesthésies. De plus, l'hyperviscosité peut aussi aggraver ou provoquer une ischémie par thrombose veineuse.

7. Troubles neurologiques.

Ils résultent le plus souvent d'un phénomène de compression médullaire après tassement vertébral. En effet, les atteintes osseuses au niveau du rachis ainsi que l'infiltration plasmocytaire peuvent comprimer la gaine nerveuse et entraîner des paralysies (paraplégie, tétraplégie). Ils nécessitent un traitement d'urgence par chirurgie, radiothérapie ou corticothérapie haute dose.

Des neuropathies périphériques peuvent aussi survenir. Elles sont liées soit à des composants monoclonaux ayant une activité antimyéline soit à des dépôts amyloïdes. Ces complications neurologiques peuvent aussi être liées aux traitements.

5) Biologie du myélome multiple.

1. Bilan protéique.

i. Analyse des protéines sériques.

Le dosage des protéines sériques mettra en évidence plusieurs anomalies. Tout d'abord, une hyperprotidémie supérieure à 100g/L est fréquemment observée. Celle-ci est le reflet du pic d'immunoglobuline monoclonale. Elle s'accompagne d'une diminution du taux des isotopes non concernés par le pic monoclonal. Une hypoalbuminémie inférieure à 30g/L est aussi observée dans 15% des cas. Cependant, une hypoprotidémie peut être retrouvée dans certains cas. On parle de MM à chaîne légère. Le taux des classes d'immunoglobulines non concernées par le pic monoclonal est réduit dans 85 à 90% des cas (24).

La réalisation d'une électrophorèse des protéines sériques (EPS) puis d'une immunofixation ou d'une immunoélectrophorèse sont indispensables au diagnostic. Les techniques habituellement utilisées sont l'électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acétate de cellulose (35). L'électrophorèse par capillaire est plus simple, plus rapide et moins coûteuse mais reste moins sensible que les techniques classiques. Ces analyses sont qualitatives par visualisation des pics, et quantitatives puisque l'aire des pics est proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

Dans 80% des cas, l'EPS mettra en évidence un pic étroit correspondant à une protéine monoclonale migrant dans la zone des gammaglobulines ou plus rarement des bêta-globulines et des alpha-2-globulines (23,24,36) (Figure 14).

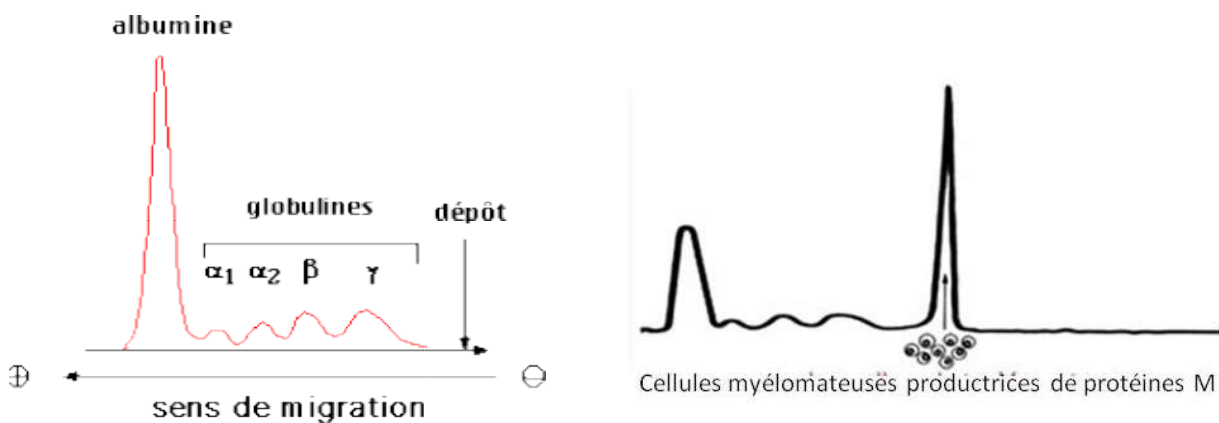


Figure 14 : Electrophorèse des protéines sériques. (a) Profil normal. (b) Profil rencontré dans 80% des cas avec pic monoclonal.

Cependant, dans certains cas, aucun pic n'est détecté à l'EPS. En l'absence de pic, un MM à chaîne légère doit être suspecté surtout lorsque celui-ci sera accompagné d'une hypogammaglobulinémie sévère.

L'immunofixation ou l'immunoélectrophorèse permettront de typer la protéine monoclonale pour sa chaîne lourde et sa chaîne légère (Figure 15). Dans 50-55% des cas, les MM sont d'isotype IgG et d'isotype IgA dans 20-25% des cas (24,33). L'immunofixation est indispensable pour différencier les gammopathies monoclonales des polyclonales, En effet, une gammopathie monoclonale oriente vers une maladie néoplasique tandis qu'une gammopathie polyclonale oriente davantage vers un syndrome inflammatoire (37).

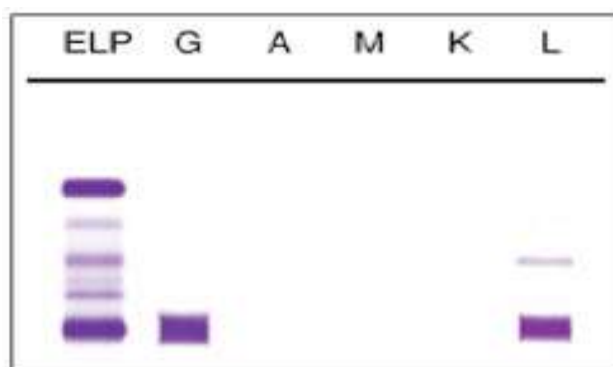


Figure 15 : Immunofixation des protéines sériques. ELP : électrophorèse sérique d'un sérum sain. A droite, profil correspondant à une gammopathie monoclonale $\gamma 2\lambda 2$ avec des chaînes λ libres.

ii. Analyse des protéines urinaires.

La quantification des protéines après concentration d'un échantillon urinaire de 24h permet de déceler une éventuelle protéinurie. La détection d'une protéinurie significative supérieure à 1g/24h peut évoquer l'existence d'un passage de chaînes légères libres dans les urines. Celles-ci sont appelées protéines de Bence-Jones. Cette analyse doit obligatoirement être accompagnée par une analyse qualitative des protéines urinaires. L'électrophorèse des protéines urinaires (EPU) permettra de confirmer le caractère monoclonal de cette protéinurie. De plus, dans le cas des MM à chaîne légère (15 à 20% des cas (23)), l'EPU est capitale car le pic est souvent absent dans le sérum mais présent dans 90 à 95% des cas dans les urines (24).

L'immunofixation mettra en évidence une protéinurie de type κ dans 60% cas et de type λ dans 40% des cas (24) (Figure 16).

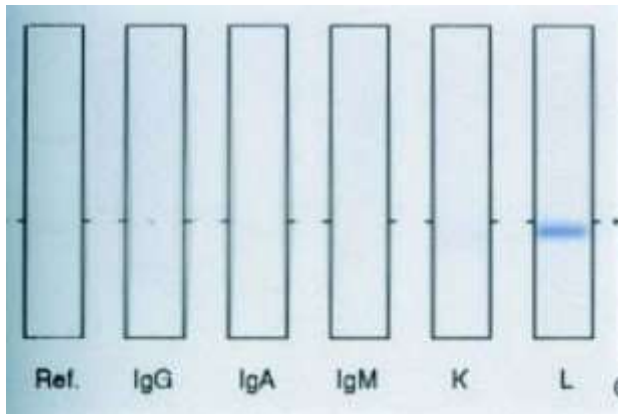


Figure 16 : Immunofixation des protéines urinaires. Réf : profil de migration d'un sujet sain. A droite, mise en évidence d'une chaîne légère λ .

Il existe une forme rare de MM correspondant aux MM non excréteur (environ 3%) (23). Ces derniers ne montrent pas de pic monoclonal à l'EPS ni à l'EPU en raison des très faibles quantités de chaînes libres sécrétées (métabolisme intracellulaire ou différences dans leur structure). Le dosage des chaînes libres du sérum permettra de le déceler lorsque l'EPS et l'EPU sont négatives (33).

L'EPS et l'EPU sont indispensables au suivi thérapeutique de la maladie. En revanche, l'isotype de la protéine monoclonale ne varie pas au cours de la maladie. Il n'est donc pas utile de répéter les immunofixations.

revanche, la mesure des FLC ne peut remplacer totalement la quantification et l'immunofixation des protéines urinaires (39).

2. Analyses biochimiques.

i. Bilan phosphocalcique.

La perturbation du bilan phosphocalcique est le reflet des phénomènes de destruction des structures osseuses. Elle se traduit par une hypercalcémie (> 2.75 mmol/L) retrouvée chez environ 10 à 20% des patients au moment du diagnostic et est une des causes des perturbations de la fonction rénale (23,33,35).

ii. Bilan rénal.

L'augmentation de la créatininémie est le marqueur principal de l'altération de la fonction rénale. Celle-ci est supérieure à 173 µmol/L chez 20 à 30% des patients nouvellement diagnostiqués et deux fois plus fréquemment dans les formes évoluées (23,33,35). Des hyperuricémies sont observées chez 15 à 30% des patients (24,35).

iii. Syndrome inflammatoire (VS et CRP).

La protéine C Réactive est un marqueur de l'activité du MM. En effet, l'augmentation de sa concentration est étroitement liée à la libération de l'IL-6. Cette interleukine est l'un des facteurs de croissance principal dans le MM car il est synthétisé par les plasmocytes tumoraux et par les cellules du microenvironnement tumoral. Cette interleukine est un fort activateur de la synthèse de la CRP. Ainsi, la CRP se retrouve augmentée dans environ 40% des cas. Celle-ci constitue un bon marqueur pronostique mais ne peut être un marqueur spécifique de l'activité du myélome en phase aiguë car elle peut être augmentée par de nombreux autres facteurs (35).

La vitesse de sédimentation (VS) se retrouve augmentée chez les patients en raison de l'hypergammaglobulinémie. Ainsi, 84% d'entre eux ont une VS supérieure à 20mm/heure et plus de 30% l'ont supérieure à 100mm/heure (24). Celle-ci se retrouve augmentée beaucoup plus fréquemment lorsque la maladie progresse. En revanche, ce paramètre peut se retrouver normal dans 10% des cas et doit faire penser à un MM à chaîne légère (35).

iv. Lactate déshydrogénase (LDH).

L'augmentation des LDH signe le caractère prolifératif de la maladie. Il est retrouvé élevé dans 20% des cas lorsque la maladie est agressive (35).

v. *B2-microglobuline (β 2-M).*

La β 2-microglobuline est l'un des facteurs pronostiques les plus pertinents. En effet, son augmentation reflète l'augmentation de la masse tumorale mais aussi la détérioration de la fonction rénale. Sa valeur doit donc être interprétée selon l'état de la fonction rénale. Ainsi, 75% présentent une β 2-M élevée. De plus, une classification pronostique a été établie en conjuguant les valeurs de la β 2-M à celles de l'albumine (24,35).

3. Hémogramme.

i. *Numération de la Formule Sanguine (NFS) et frottis sanguin.*

La NFS montrera chez 65 à 70% des patients une anémie normochrome, normocytaire modérée (Hb < 10g/dL). Cependant, celle-ci peut être sévère dans 20% des cas (Hb < 8g/dL).

La thrombopénie est retrouvée dans seulement 10 à 15% des cas et révèle une haute infiltration plasmocytaire au sein de la moelle osseuse.

Le taux de leucocytes reste généralement dans les valeurs normales excepté dans les stades très avancés ou après chimiothérapie.

Le frottis mettra en évidence des hématies dites en rouleau (Figure 18).

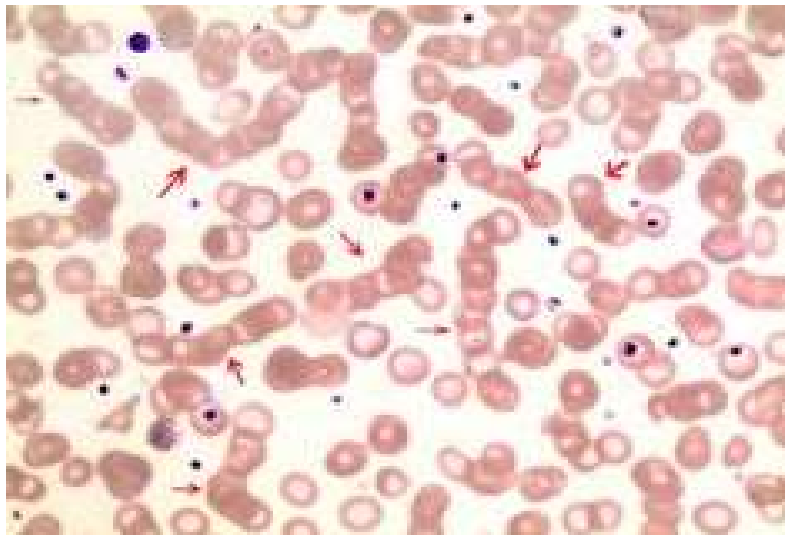


Figure 18: Hématies en rouleau visualisées sur frottis sanguin.

La présence de plasmocytes circulants est rare. En effet, ces derniers sont retrouvés à un faible taux (2% ou plus) chez environ 15% des patients (35,40). Cependant, l'utilisation de méthodes plus sensibles (immunophénotypage, PCR) peut augmenter l'incidence des plasmocytes circulants de 50% à 70% (41). La détection de ces cellules caractérise un stade

avancé de la maladie et constitue un facteur pronostique (40,42). Lorsque le taux de plasmocytes circulants dépasse 20% des cellules et/ou 2G/L, on parle de leucémie à plasmocytes. Celle-ci est dite primitive lorsqu'elle est présente au moment du diagnostic, et secondaire lorsqu'elle résulte d'une transformation d'un MM (23).

ii. Myélogramme.

Le MM étant une pathologie essentiellement médullaire, un myélogramme est indispensable pour établir un diagnostic. L'échantillon de moelle est prélevé par aspiration, généralement au niveau sternal ou iliaque, coloré au MGG puis observé au microscope. Celui-ci met en évidence une infiltration plasmocytaire représentant au moins 10% des éléments nucléés chez plus de 90% des patients (24). Le taux de plasmocytes peut atteindre 90 % voire plus dans certains cas (23). En revanche, selon le site d'aspiration, ce pourcentage peut varier de façon importante en raison de la distribution hétérogène des plasmocytes au sein de la moelle osseuse. En effet, le prélèvement par aspiration sous-estime le pourcentage d'infiltration chez 20% des patients. L'aspiration peut même se révéler normale chez certains.

La biopsie ostéo-médullaire permet l'analyse de la morphologie des plasmocytes et une évaluation plus précise de l'infiltration de la moelle osseuse (35,43). La ponction de moelle osseuse reste cependant l'examen de référence. La biopsie sera réalisée lorsque celle-ci se révèle non contributive après deux essais sur deux territoires différents.

Dans le MM, la morphologie des plasmocytes est très hétérogène. Quatre sous types de plasmocytes ont été identifiés selon leur degré de maturation (44) (Figure 19):

- Plasmoblastes avec un rapport nucléo-cytoplasmique très élevé, un gros noyau central, peu de cytoplasme, une chromatine fine et immature, un nucléole et un cytoplasme réduit.
- Pré-plasmocyte: Catégorie intermédiaires correspondant au pré-plasmocyte.
- Immatures : large noyau, excentré, avec chromatine diffuse et parfois des nucléoles de grande taille et un cytoplasme abondant.
- Matures avec noyau de petite taille, excentré, chromatine dense en amâts et cytoplasme basophile bien développé.

L'étude de la morphologie des plasmocytes n'est pas indispensable au diagnostic mais elle peut constituer un facteur pronostique.

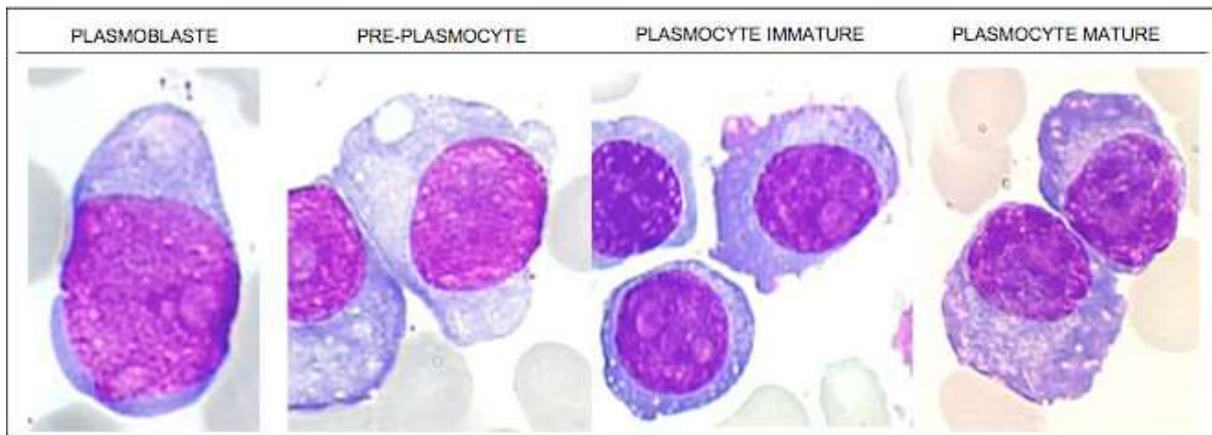


Figure 19 : Aspects morphologiques des plasmocytes selon leur stade de maturation.

Un algorithme a ainsi été mis en place pour établir le degré de maturation des plasmocytes tumoraux en fonction des critères cités précédemment (Figure 20) (45) :

D'après Goasguen et al. 1999

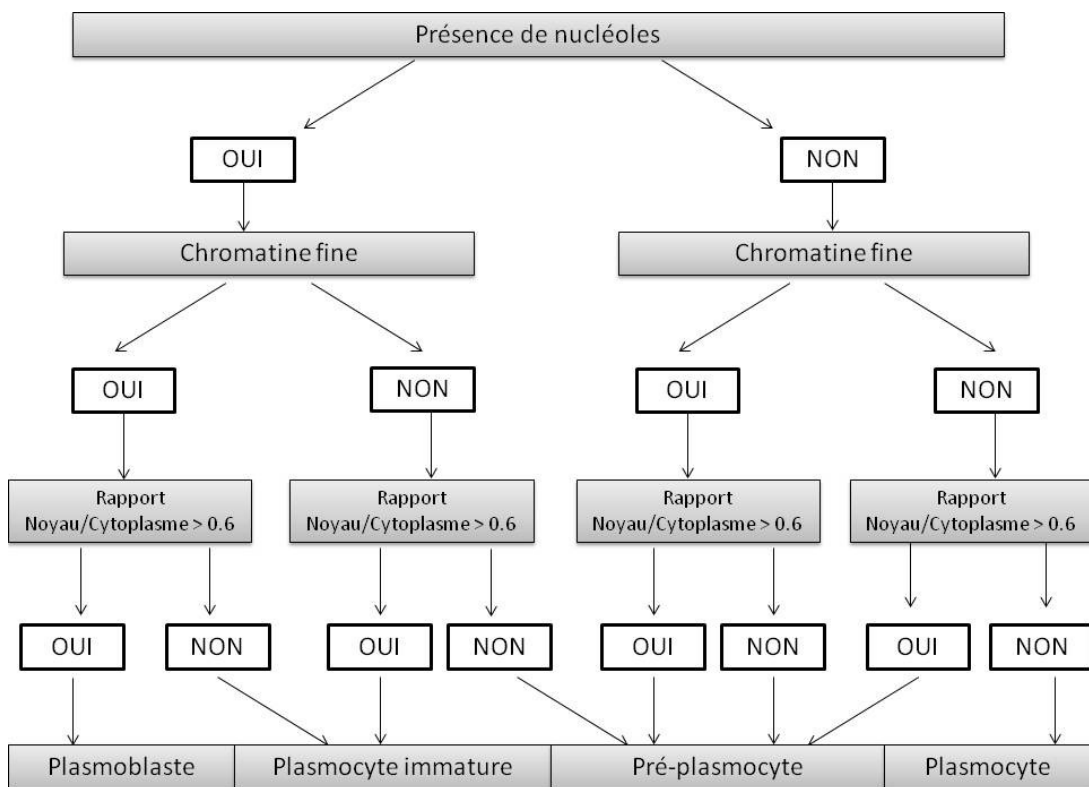


Figure 20 : Algorithme de détermination du stade de maturation des plasmocytes tumoraux.

D'autres anomalies cellulaires ayant plus ou moins de valeurs pronostiques ont été identifiées. Ces anomalies ne sont cependant pas spécifiques du myélome. On observe ainsi des cellules de Mott caractérisées par des inclusions cytoplasmiques de tailles homogènes (Figure 21 a), des corps de Russell correspondant à des sphères de couleurs rouge ou jaune

ou des corps de Dutcher qui sont des inclusions situées dans le noyau (Figure 21 b). Ces anomalies sont liées à l'accumulation d'Ig au sein du cytoplasme (46).

B. Ribourtaut et al. 2015

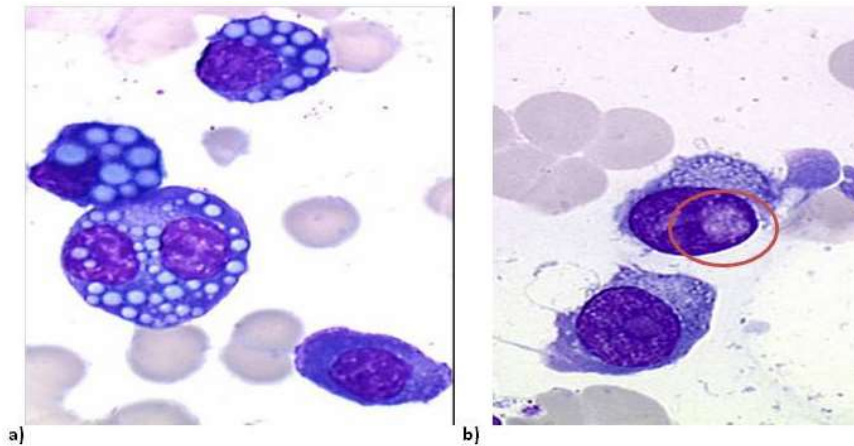


Figure 21 : Inclusions cytoplasmiques correspondant aux cellules de Mott (a) et inclusions nucléaires correspondant aux corps de Dutcher (b) (cercle rouge).

On observe de plus des plasmocytes avec cytoplasme dit flammé (Figure 22a), polynucléaires ou bien avec des contours très irréguliers (Figures 22b et c). Des cristaux cytoplasmiques correspondant à une accumulation de chaînes légères peuvent être retrouvés notamment chez des patients avec Syndrome de Fanconi (Figure 22d) (46,47).

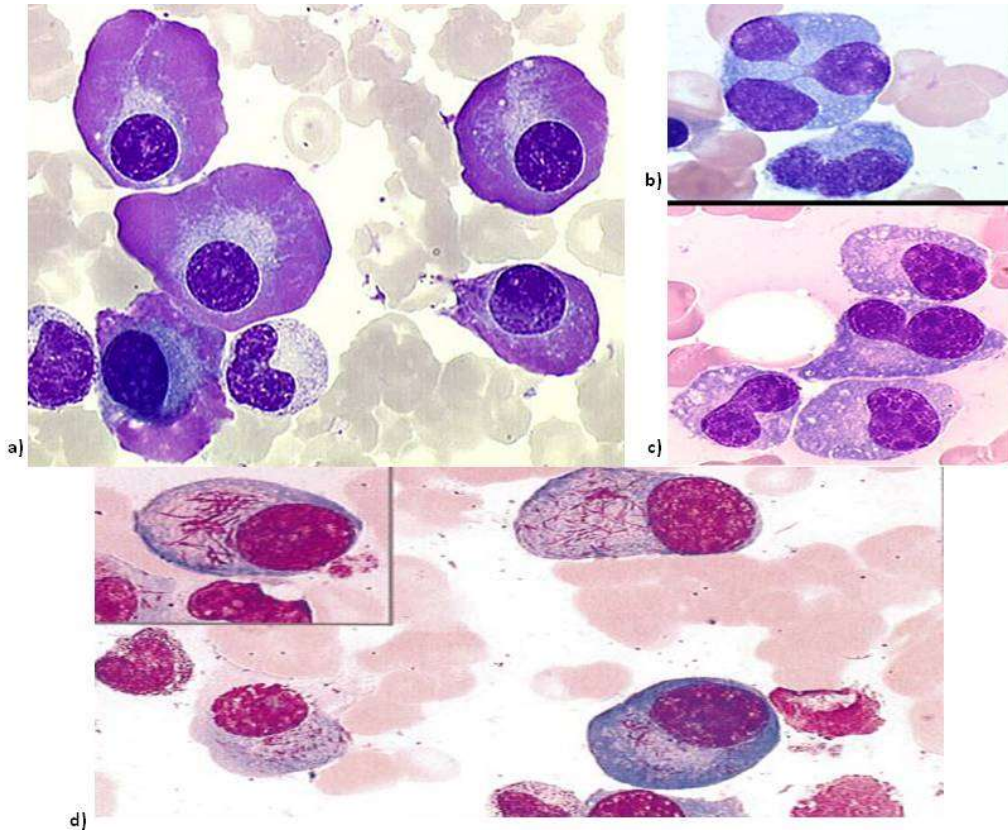


Figure 22 : Plasmocytes à cytoplasme flammé (a), à noyau irrégulier polylobé (b) ou à aspect d'haltère (c). Inclusions cristalloïdes intracytoplasmiques (d).

6) *Diagnostic.*

1. Critères diagnostiques.

Le diagnostic du MM peut se faire sur des manifestations rénales (altération de la fonction rénale), hématologique (anémie) ou osseuses. Dans certains cas, celui-ci se fait de façon fortuite lors de la découverte d'un pic monoclonal lors d'une EPS ou bien d'une VS augmentée.

La confirmation repose donc sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques bien définis. En effet, l'expression clinique varie de façon importante d'un patient à l'autre allant de formes asymptomatiques à des formes d'emblée agressives. Ces différentes formes se succédant souvent lors de l'évolution de la maladie.

Le diagnostic du MM repose sur l'association de critères internationaux établis à partir des travaux de l'International Myeloma Working Group (IMWG) (48,49):

- Mise en évidence d'une plasmocytose médullaire représentant au moins 10% des cellules nucléées de la moelle osseuse.
- Présence d'une immunoglobuline monoclonale sérique d'au moins 30g/L (protéine M) ou urinaire (protéinurie de Bence-Jones). Un taux d'IgA > 25 g/dL est considéré comme équivalent à 30 g/dL d'IgG.
- Présence d'une ou plusieurs atteinte(s) d'un organe compatible avec le tableau clinique du MM et ne pouvant être expliquée autrement : Related Organ or Tissue Impairment (ROTI). Leur atteinte est une conséquence directe de la prolifération clonale des plasmocytes tumoraux. Leur mise en évidence repose sur plusieurs éléments désignés sous l'acronyme « CRAB » :
 - HyperCalcémie supérieure à 2.75 mmol/L ou augmentée de plus de 0.25 mmol/L par rapport aux valeurs normales.
 - Atteinte Rénale avec créatininémie 177 mmol/L ou clairance de la créatinine < 40 mL/min.
 - Anémie avec taux d'hémoglobine < 10 g/dL ou diminuée de 2g/dL par rapport aux valeurs normales.
 - Au moins une lésion osseuse (Bone) pouvant détectée par scanner (CT) ou TEP/CT notamment pour les formes asymptomatiques (48).

La présence conjointe des deux critères biologiques et d'au moins un des éléments du CRAB confirment le diagnostic du MM. Toutefois, la mise en évidence d'une plasmocytose médullaire d'au moins 60% avec aucun critère CRAB conduit systématiquement au diagnostic de MM en raison du haut risque d'apparition de signe clinique dans un court délai (48). De même, la présence d'un FLC ratio ≥ 100 associé à une plasmocytose > 10% suffit au diagnostic du myélome.

L'ensemble de ces critères a aussi permis d'établir une classification internationale des différentes formes cliniques de la maladie (Tableau 1).

Dans le cas des MM non excréteur, une infiltration médullaire supérieure à 30% permet d'affirmer le diagnostic (50).



Plasmocytome solitaire	Lésion osseuse secondaire à une prolifération plasmocytaire. Site unique de plasmocytose médullaire. Plasmocytose médullaire < 10% = plasmocytome avec retentissement médullaire minime.
Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS).	Protéine M sérique < 30 g/L ou urinaire < 500 mg/24h ET Plasmocytose médullaire < 10% des cellules nucléées. FLC ratio anormal (< 0.26 ou > 1.65) = MGUS à chaîne légère.
Smoldering Multiple Myeloma (SMM)	Protéine M sérique ≥ 30 g/L OU protéine monoclonale urinaire ≥ 500 mg/24h ET/OU Plasmocytose médullaire de 10 à 60% des cellules nucléées.
Symptomatic Multiple Myeloma (MM)	Plasmocytose médullaire ≥ 10% des cellules nucléées ET l'un des critères suivants : <ul style="list-style-type: none"> • CRAB • Plasmocytose médullaire ≥ 60% • FLC ratio ≥ 100 • Plus d'une lésion osseuse d'au moins 5 mm

Tableau 1 : Présentation des différentes formes cliniques du MM au cours de l'évolution de la maladie (IMWG ; 2014).

Le plasmocytome solitaire est un stade relativement précoce de la maladie. Celui-ci ne représente que 3 à 5% des néoplasies plasmocytaires. L'âge médian de survenue est plus jeune que dans le MM (55ans au lieu de 65ans) et 50% des patients progressent vers le MM (23). Le MGUS représente un stade plus avancé de la maladie et se retrouve chez 3% de la population âgée de 50 ans et plus. Le risque de progression vers le MM est de 1% par an. Ainsi, après 25 ans, le risque de progression est de 25% (17). Le SMM représente une forme plus évoluée en raison de l'augmentation de la plasmocytose médullaire et/ou de la protéine M sérique. Le risque de progression est lui aussi plus important (10% par an)(49).

2. Diagnostic différentiel.

Lorsque le tableau clinico-biologique est complet, le diagnostic de MM pose peu de doutes. En revanche, lorsque les éléments essentiels (plasmocytose, protéine M et atteinte organique) ne sont pas tous présents, le diagnostic peut devenir difficile à affirmer avec

certitude. En effet, l'apparition de lésions osseuses à l'imagerie peut faire penser à une ostéoporose sévère ou bien à une localisation secondaire d'un cancer. Cependant, le myélogramme et l'électrophorèse des protéines sériques et urinaires écartent ces diagnostics.

D'autre part, la présence d'une gammopathie monoclonale peut être rencontrée dans d'autres situations. C'est le cas de la maladie de Waldenström, définie comme une gammopathie monoclonale à IgM avec prolifération lymphoplasmocytaire ou l'amylose AL primaire qui peut être apparentée au MM. Des plasmocytoses réactionnelles polyclonales peuvent aussi être rencontrées lors de syndrome mononucléosiques, de rubéole ou d'hépatites virales. Des plasmocytoses médullaires peuvent aussi être rencontrées lors de réactions allergiques, de viroses, de maladies auto-immunes ou même dans d'autres hémopathies telles que certains lymphomes T.

7) Critères pronostiques.

La survie globale médiane pour le MM est de 6 ans (51). Cependant, de grandes variations dans l'évolution de la maladie ont été observées entre les patients. De nombreux facteurs (cliniques, biologiques, cytogénétiques...) ont été identifiés comme ayant une influence notable sur la survie globale mais aussi sur la vitesse de progression et la sensibilité aux traitements. Leur connaissance est donc indispensable afin d'identifier les patients à risque et optimiser leur prise en charge.

1. Classification de Durie et Salmon.

La classification de Durie et Salmon est l'une des premières classifications établie en 1975 afin d'évaluer de façon fiable l'évolution de la maladie. Celle-ci se base sur des critères cliniques (étendue des lésions osseuses par imagerie radiologique) et biologiques (fonction rénale, calcémie, taux d'hémoglobine, taux sérique et/ou urinaire de la protéine M). L'ensemble de ces facteurs permet de classer les patients en 3 groupes selon la masse tumorale, l'état de la fonction rénale et distinguer les patients à haut risque de ceux à faible risque (Tableau 2) (52).

Critères <i>Masse tumorale</i> <i>Critères requis</i>	Stade I <i>Faible</i> <i>Tous</i>	Stade II <i>Intermédiaire</i> <i>Ni I ni III</i>	Stade III <i>Elevée</i> <i>Au moins 1</i>
Protéine M	Sérique : IgG < 50g/L IgA < 30 g/L Urinaire < 4g/24h	Ni I ni III	Sérique : IgG > 70 g/L IgA > 50 g/L Urinaire > 12g/24h
Hémoglobine	> 10 g/dL		< 8.5 g/dL
Calcémie	≤ 120 mg/mL ou 3 μM		> 120 mg/dL ou 3 μM
Lésions osseuses	≤ 1		≥ 3
Estimation de la masse tumorale (nombre de cellules).	< 0,6.10 ¹²		>1,2.10 ¹²
Sous-classification : A B	A : créatininémie < 20 mg/L soit 175 μmol/L B : créatininémie ≥ 20 mg/mL soit 175 μmol/L		

Tableau 2 : Tableau de la classification de Durie et Salmon (1975).

Les patients classés dans le stade III sont classés dans la catégorie dite à haut risque tandis que ceux classés dans le stade I sont dits à faible risque.

2. International Staging System (ISS).

Plus récemment, une nouvelle classification internationale a été adoptée. Celle-ci a pour objectif d'établir une évaluation pronostique du MM en se basant sur des critères objectifs pouvant être facilement évalués à l'échelle mondiale. En effet, bien que la classification de Durie et Salmon fut largement utilisée comme référence internationale fiable, l'évaluation du nombre de lésions osseuses demeurait observateur dépendante. Ainsi, la nouvelle classification tient compte de deux paramètres biologiques facilement évaluables et fortement corrélés à la survie des patients : la β_2 -microglobulinémie et l'albuminémie (Tableau 3) (53).

Critères	Stade I	Stade II	Stade III
β_2 -microglobulinémie	< 3.5 mg/L	Ni I ni III	\geq 5.5 mg/L
Albuminémie	\geq 35 mg/L		< 35 mg/L
Survie médiane	62 mois	44 mois	29 mois

Tableau 3 : Tableau de la classification ISS d'après Greipp et al. 2005.

Dans le stade II, seule la β_2 - microglobuline est prise en compte. Celle-ci est exprimée à la surface des plasmocytes malins avant d'être relarguée dans le sérum par clivage protéolytique. Ainsi, son augmentation est associée à une augmentation de la masse tumorale. L'interprétation des taux sériques de β_2 - microglobuline doit être faite avec prudence car une altération de la fonction rénale peut aussi entraîner une augmentation de la β_2 - microglobuline

3. Critères cytogénétiques.

La classification de Durie et Salmon et l'ISS sont importantes pour l'estimation de la survie médiane des patients mais restent peu adaptées pour l'estimation de la réponse aux nouveaux traitements. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence que certaines anomalies cytogénétiques avaient une influence sur la survie des patients mais pouvaient aussi constituer un facteur prédictif de réponse aux traitements. De plus, ces anomalies génétiques ont un impact pronostique indépendant de l'ISS.

De nombreuses études ont montré par analyses FISH que certaines anomalies génétiques sont étroitement corrélées à une diminution de la survie médiane des patients. Les délétions 13, 17p ainsi que le gain de copie sur le bras long du chromosome 21 (54) sont associés à une réduction significative des survies globales et sans progression des patients (14).

The Mayo Stratification for Myeloma and Risk Adapted Therapy (mSMART) a classé les anomalies observées selon trois niveaux de risque. Les translocations t(14 ;16), t(4 ;20) et la délétion du bras court du chromosome 17 (del17p) sont rangées parmi les anomalies à haut risque tandis que la t(4 ;14) et la del 13 sont associées à un niveau de risque intermédiaire. Les translocations t(11 ;14) et t(6 ;14) sont classées en faible risque (55) (Tableau 4).



	Haut risque	Risque intermédiaire	Faible risque
Anomalies génétiques	FISH : <ul style="list-style-type: none"> • Del 17p • t (14;16) • t (14;20) GEP: Signature à haut risque	FISH: <ul style="list-style-type: none"> • t (4;14) • Del 13 • Hypodiploïdie PCLI \geq 3%	Autres anomalies incluant notamment: FISH: <ul style="list-style-type: none"> • t (11;14) • t (6;14)
Survie médiane	3 ans	4 à 5 ans	8 à 10 ans

Tableau 4 : Tableau de classification des anomalies cytogénétiques mSMART (JR. Mickael et al.).

La classification des anomalies selon leur niveau de risque a pour objectif d'adapter la stratégie thérapeutique. Il est ainsi recommandé de réaliser une FISH avant l'initiation du traitement. Les patients classés dans le groupe à haut risque doivent impérativement recevoir un traitement associant plusieurs cytotoxiques afin de ralentir la progression de la maladie. En revanche, pour les patients à faible risque avec maladie indolente, l'utilisation d'agents moins toxiques avec des périodes d'abstention thérapeutique peut être recommandée (55). Combinée à l'ISS, la classification mSMART apporte des informations supplémentaires sur la survie globale des patients après traitements d'induction et de maintenance et permet d'établir des recommandations de traitement en fonction du risque cytogénétique.

La présence d'une mutation sur les récepteurs aux TNF TRAF3 est un facteur prédictif de réponse au bortézomib (56).

4. Caractéristiques morphologiques des plasmocytes.

L'hétérogénéité du MM réside aussi dans la morphologie des plasmocytes infiltrant la moelle osseuse. En effet, lors des prélèvements de moelle osseuse, on retrouve des stades de maturations des plasmocytes variables d'un patient à l'autre. La classification des MM en fonction du stade de maturation des plasmocytes montre que les MM à cellules plasmablastiques étaient associés à une survie plus faible (57,58) tandis que ceux à plasmocytes matures sont de meilleur pronostic (45). En revanche, aucune valeur pronostique n'a pu être rattachée à la présence de modifications cytoplasmiques au sein des plasmocytes tumoraux (47).

Même si la morphologie plasmocytaire est un facteur pronostique reconnu, celle-ci reste peu étudiée en pratique en raison de son manque de reproductibilité et de sa faible objectivité. De plus, cette classification ne met en évidence qu'une faible proportion de patients de mauvais pronostic.



5. Autres facteurs pronostiques.

D'autres marqueurs biologiques sont associés à de meilleurs pronostics. C'est le cas de la FLC dont l'augmentation est associée à une amélioration de la réponse au traitement et de la survie globale. Un taux d'hémoglobine bas et un pic monoclonal à IgA sont aussi des facteurs de bon pronostic. En revanche, l'âge, l'hypocalcémie, une élévation de la CRP et l'altération de la fonction rénale sont de mauvais pronostic (59).

8) **Prise en charge thérapeutique.**

L'instauration d'un traitement doit se faire uniquement chez les patients au stade myélome symptomatique. En effet, le traitement des formes asymptomatiques (SMM, MGUS) n'a pas entraîné d'augmentation de la survie globale et s'avère même délétère en raison de sa toxicité (50). Cependant, dans les SMM ou MGUS avec une plasmocytose médullaire dépassant 60% des cellules nucléées, l'initiation du traitement est fortement recommandée en raison du fort risque de progression vers un MM symptomatique. De plus, un ratio FLC fortement altéré justifie la mise en route d'un traitement en raison du risque élevé d'atteinte rénale (55).

1. Molécules disponibles.

Le melphalan (agent alkylant) a longtemps été la molécule de référence dans le traitement du MM. Sa première utilisation remonte à 1962. Son association avec les corticoïdes (prednisone, dexaméthasone) a permis une survie sans progression de 18 mois en moyenne ainsi qu'une survie globale médiane de 2 à 3 ans (24,60).

Depuis, de nombreuses associations de cytotoxiques tels que vincalcaloïdes (vincristine), des agents alkylants (cyclophosphamide, sels de platine), des anthracyclines (adriamycine, doxorubicine liposomale) ou les inhibiteurs de la topoisomérase I (étoposide) ont été utilisées sans amélioration significative. Depuis le milieu des années 90, les associations de chimiothérapies à hautes doses sont suivies d'autogreffe de cellules souches. Ces nouvelles stratégies ont permis une nette augmentation des taux de réponse mais aussi de la survie des patients (61).

Depuis le début des années 2000, de nouveaux agents ont fait leur apparition. Le premier d'entre eux est la thalidomide qui fait partie de la classe des immunomodulateurs (IMiD). Son action anti-angiogénique a motivé son utilisation dans le MM mais il agit selon plusieurs mécanismes d'action (anti-inflammatoire, immunomodulateur). Les bons résultats apportés depuis son utilisation (62,63) conjugués à une neurotoxicité marquée ont amené au développement de molécules analogues telles que le lenalidomide ou le pomalidomide avec des toxicités moins marquées. Le bortezomib, inhibiteur du protéasome (IP), a fait son

apparition au début des années 2000. Son action anti-tumorale repose sur une induction de l'apoptose des plasmocytes tumoraux, une inhibition de leur prolifération ainsi qu'une inhibition des liaisons avec les cellules du microenvironnement tumoral (Figures 23 et 24) (64). Le bortezomib empêche la dégradation de l'I κ B et donc l'activation de la voie NF- κ B qui joue un grand rôle dans la progression et la résistance aux traitements conventionnels (65,66).

F. Pasquier et al. 2006 (67)

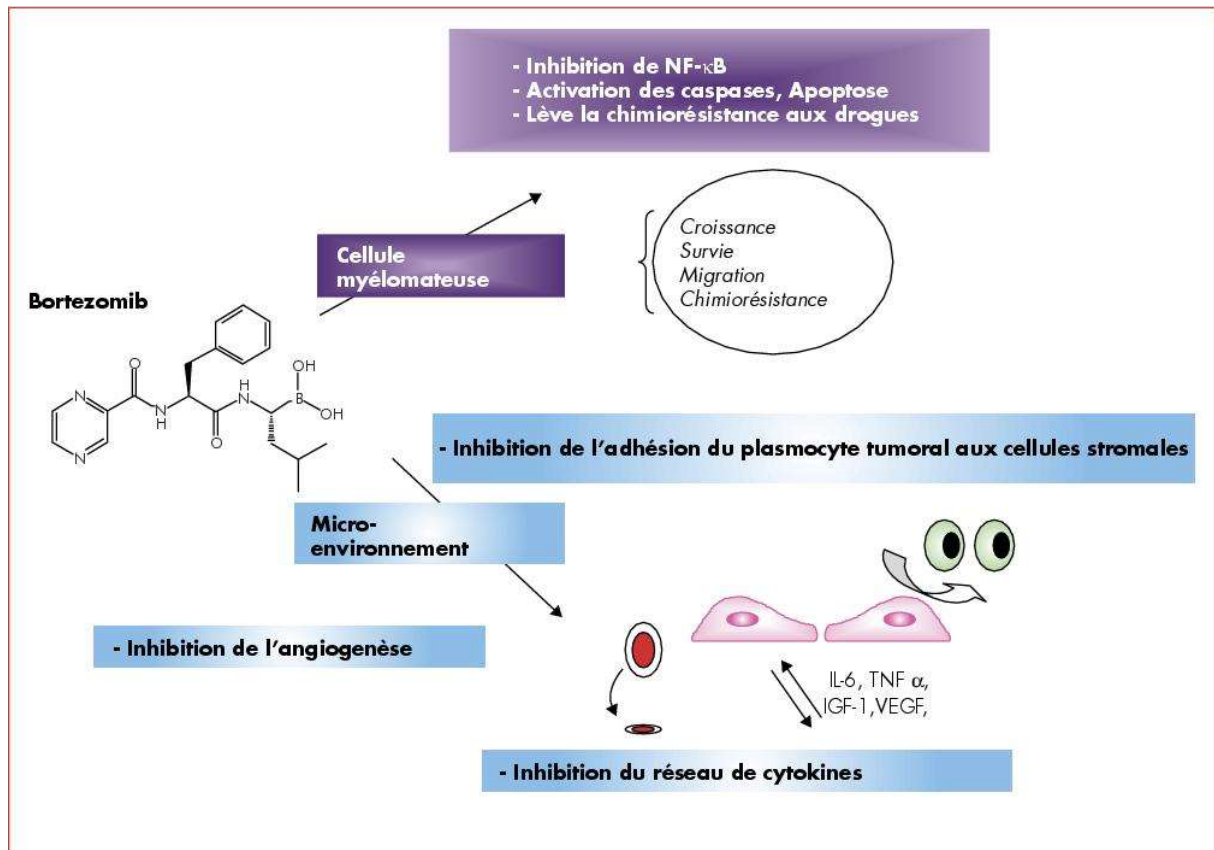


Figure 23 : Action du Bortezomib dans le Myélome Multiple. En inhibant l'activation de la voie NF- κ B, le Bortezomib induit un effet sur les plasmocytes tumoraux mais aussi sur les cellules du microenvironnement.

Le traitement des patients en rechute par bortezomib a permis l'obtention de meilleurs résultats par rapport au traitement par dexaméthasone à hautes doses (68). De plus, l'utilisation du bortezomib en 1^{ère} ligne, en association avec d'autres agents cytotoxiques a montré une grande efficacité (69). La principale toxicité est neurologique mais elle est le plus souvent réversible et elle peut peut-être être minorée par une administration sous cutanée. Aujourd'hui, la thalidomide, le bortezomib ainsi que le lenalidomide font partis des traitements de référence du MM.

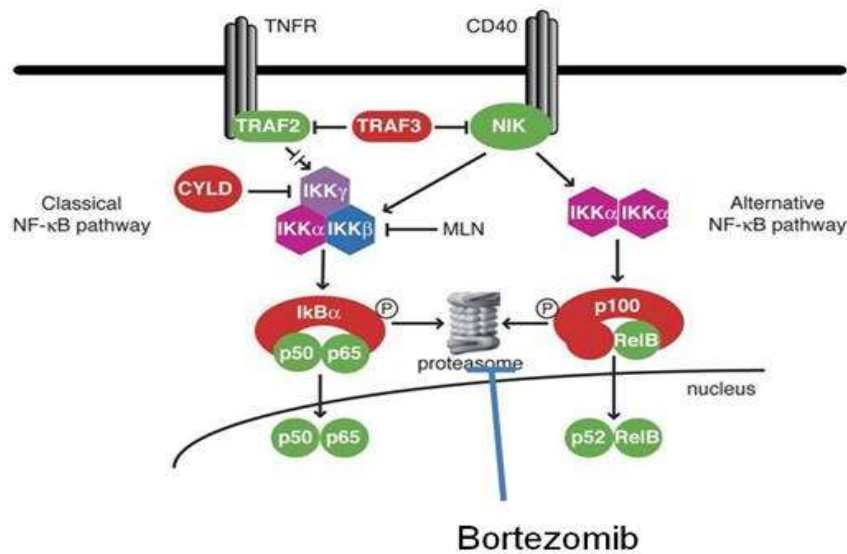


Figure 24 : Action du Bortezomib sur la voie NF-κB. L'inhibition du protéasome empêche la dégradation d'IκB et donc l'activation de NF-κB.

2. Stratégies thérapeutiques chez le sujet jeune (moins de 65 ans).

Les patients jeunes (moins de 65 ans ou 70 ans d'âge physiologique) sans altération majeure d'organe (cardiaque, rénale, hépatique, pulmonaire) sont éligibles à l'autogreffe de cellules souches.

L'autogreffe repose tout d'abord sur une phase d'induction constituée par l'association de plusieurs molécules telles que la thalidomide, le bortezomib et un agent alkylant (cyclophosphamide ou melphalan) sur 4 cycles. L'association sera choisie notamment en fonction du risque cytogénétique retrouvé après l'analyse par FISH. L'objectif est l'obtention d'au moins une réponse partielle avant la phase d'intensification par chimiothérapie à hautes doses. Plusieurs associations ont été utilisées en phase d'induction (Tableau 5) avec des taux de réponses variables d'un protocole à l'autre. L'arrivée des nouveaux agents tend à faire disparaître définitivement l'association VAD en raison de sa moindre efficacité et de sa plus grande toxicité (71). De plus, l'utilisation de schémas avec trithérapie (VTD, VRD ou VCD) tend à donner de meilleurs résultats que les bithérapies.

Protocoles	RR	CR et VGPR	PFS	Survie à 3 ans
RD (lenalidomide + dexaméthasone hautes doses)	81%	50%	19.1 mois	75%
Rd (lenalidomide + dexaméthasone faibles doses)	70%	40%	25 à 31mois	74%
VAD (vincristine + adriamycine + dexaméthasone)	63%	15%	30 mois	77%
VD (vincristine + dexaméthasone)	79%	38%	36 mois	81%
TD (thalidomide + dexaméthasone)	79%	28%	40 mois	84%
VTD (bortezomib + thalidomide + dexaméthasone)	93%	62%	NR	86%
VRD (bortezomib + lenalidomide + dexaméthasone)	94%	58%	NR	100%

Tableau 5: Tableau récapitulatif des différents protocoles de chimiothérapies d'induction utilisés ainsi que leur efficacité. RR : taux de réponse ; CR : Réponse complète ; VGPR : très bonne réponse partielle ; PFS : survie sans progression (55,72),

La deuxième partie de la stratégie consiste en une phase de collecte des cellules souches hématopoïétiques (CSH) avec utilisation de facteurs de croissance granulocytaires (G-CSF). En cas d'échec du recueil des CSH, une deuxième tentative peut être réalisée avec G-CSF associé au plerixafor. Ensuite une phase intensification thérapeutique avec du melphalan haute dose (200mg/m²) est réalisée afin d'obtenir une myélosuppression. Les CSH collectées sont réinjectées à la fin de la phase d'intensification. Si une très bonne réponse partielle n'est pas obtenue à l'issue de la première autogreffe, une deuxième peut être réalisée afin d'augmenter les chances d'efficacité du traitement (73).

Une phase de consolidation reprend l'association des traitements de l'induction sur 2 cycles puis un traitement d'entretien est instauré. Ce dernier a longtemps été discuté en raison des faibles apports dans l'efficacité de la prise en charge mais aussi de la forte toxicité entraînée par l'utilisation prolongée des cytotoxiques souvent à l'origine d'interruption précoces. Cependant, l'arrivée du lenalidomide semble apporter un bénéfice dans la survie globale des patients (50,55).

Selon le niveau de risque, le protocole utilisé sera variable. Ainsi, pour des maladies à haut risque (ISS grade II et cytogénétique de haut risque), on privilégiera une association agressive afin d'augmenter les chances d'efficacité. En revanche, dans le cas de maladie à



faible risque (ISS grade I et cytogénétique à faible risque), on s'orientera vers une association présentant une toxicité plus limitée (Figure 25).

JR. Mickael et al. 2013

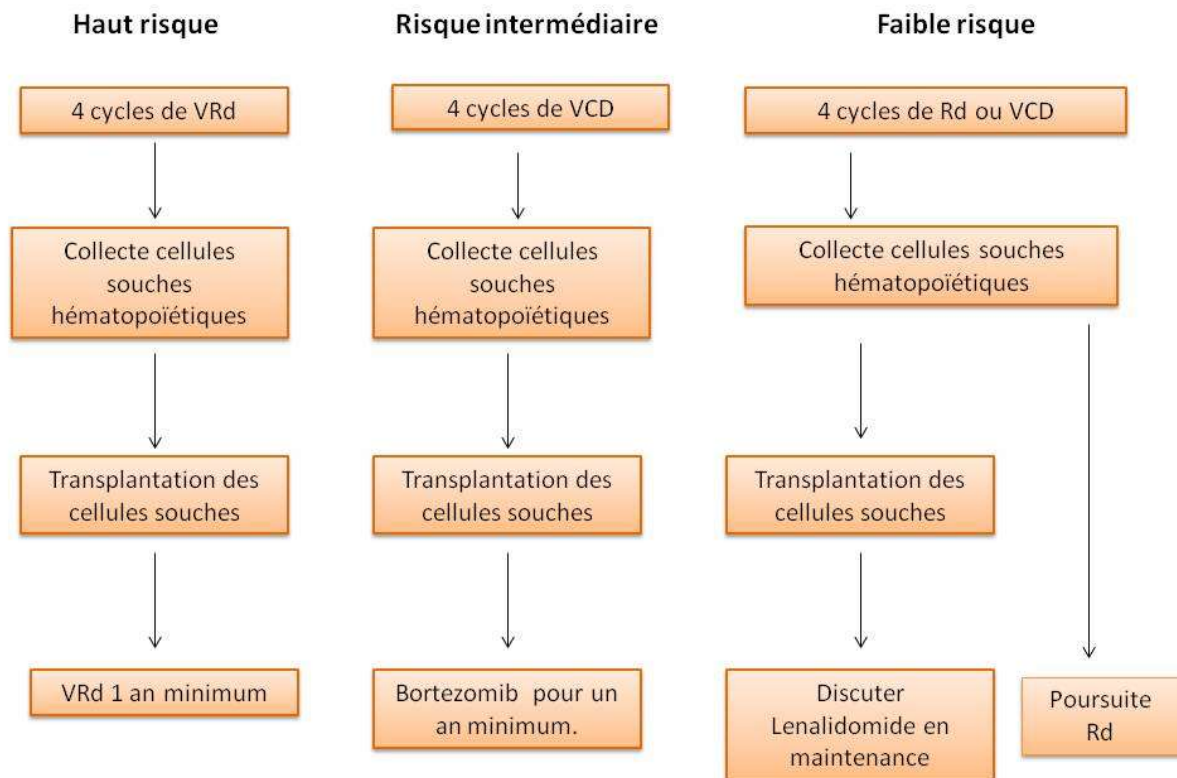


Figure 25 : Schéma récapitulatif des traitements d'induction pré-greffe en fonction des niveaux de risque de la maladie.

3. Stratégies thérapeutiques chez le sujet âgé (plus de 65 ans).

Chez les patients non éligibles à l'autogreffe, le traitement a longtemps reposé sur l'association melphalan - prednisone. Depuis l'arrivée des nouvelles thérapies, l'ajout de la thalidomide ou du bortezomib à la bithérapie a permis une amélioration de l'efficacité de la prise en charge.

Ainsi, pour les patients en bon état général, les trithérapies comme melphalan + prednisone + bortezomib ou thalidomide (MPV ou MPT) sont devenues le traitement d'induction standard pour ces patients (50).

Pour les patients présentant des co-morbidités, les traitements à deux cytotoxiques comme lenalidomide + dexaméthasone sont à privilégier. Pour ces patients, il a été montré que

l'utilisation de la dexaméthasone à faible dose (Rd) donnait de meilleurs résultats par rapport à la dexaméthasone haute dose (RD) (75).

4. Traitement du myélome en rechute

Le myélome étant une maladie incurable, tous les patients sont amenés à rechuter. Le pronostic des patients en rechute reste pauvre malgré les nouveaux traitements disponibles (lenalidomide, bortézomib).

Pour les patients ayant subi une autogreffe de CSH, si la rechute survient au moins 2 ans après, il est possible d'en envisager une seconde.

Si la rechute intervient au moins 6 mois après la fin de la première ligne de traitement, il est possible de réadministrer les mêmes molécules.

Dans le cas de rechutes agressives, précoces ou de patients âgés, il est nécessaire de changer de ligne. L'un des traitements standard est l'association lenalidomide-dexaméthasone faible dose (Rd). Il est aussi possible d'utiliser le bortézomib associé à la dexaméthasone (VD) ou au lénalidomide (VR).

Le pomalidomide est un immunomodulateur dérivé de la thalidomide. Il est actuellement indiqué dans le traitement du myélome multiple en rechute en association avec la dexaméthasone (76). Des études évaluant l'association du pomalidomide à d'autres agents thérapeutiques sont en cours d'évaluation.

5. Nouvelles molécules.

Plusieurs nouvelles molécules en cours de développement ou récemment approuvées ont montré de bons résultats dans le traitement des patients en rechute ou réfractaires aux traitements de référence.

i. Anticorps monoclonaux.

Le daratumumab est le premier anticorps monoclonal à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis. Celui-ci est indiqué en monothérapie pour le traitement du MM en rechute après au moins 3 lignes de thérapie incluant un inhibiteur du protéasome (IP) et un IMiD (thalidomide, revlimid, pomalidomide.). Le daratumumab est dirigé contre le CD38 exprimé de façon importante par les cellules myélomateuses. La liaison de l'anticorps à sa cible entraîne une cytotoxicité à médiation cellulaire induite par anticorps (ADCC) mais aussi par le complément (CDC) (77).

Cette autorisation de mise sur le marché a été délivrée en novembre 2015 tout d'abord sur la base d'études de phases I puis II ayant testé la tolérance et l'efficacité du daratumumab en monothérapie chez des patients multiréfractaires (78,79). Par ailleurs, le daratumumab, en



association avec le lenalidomide et la dexaméthasone, chez des patients multiréfractaires, est en cours d'évaluation dans une étude de phase III (80).

L'elotuzumab est un anticorps ciblant la molécule d'activation lymphocytaire F7 SLAMF7 exprimée sur les cellules myélomateuses, les lymphocytes NK et d'autres cellules immunitaires. La fixation de l'elotuzumab induit une ADCC mais aussi une rupture des liaisons entre les plasmocytes tumoraux et les cellules stromales (80). Les études de phases I et II en association avec le lenalidomide et la dexaméthasone ont montré des résultats très encourageants. Une étude de phase III confirme l'intérêt de l'association de l'anti SLAMF7 à la bithérapie (80).

ii. Carfilzomib.

Le carfilzomib est le 2^e inhibiteur du protéasome utilisé pour le traitement du MM. Il est actuellement indiqué aux Etats-Unis pour le traitement du MM en rechute, après utilisation d'au moins trois lignes de traitement, en association avec le lenalidomide et la dexaméthasone (KRD). Les très bons résultats obtenus posent la question du positionnement de cette molécule dans la prise en charge des MM. En effet, l'association du carfilzomib à la dexaméthasone semble supérieure à celle utilisant le bortézomib (VD) (81).

iii. Panobinostat.

La panobinostat est un inhibiteur de l'histone désacétylase. Il permet l'inhibition de la formation des agrégomes, voie de dégradation alternative au protéasome. Ainsi, son utilisation permet de contrer les résistances acquises aux inhibiteurs du protéasome (49). Il est indiqué depuis octobre 2015, en association avec le bortézomib et la dexaméthasone, dans le traitement du MM en rechute après au moins deux lignes de traitement incluant le bortézomib et un immunomodulateur.

iv. Ixazomib.

L'ixazomib est un nouvel inhibiteur du protéasome ayant reçu une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis pour le traitement des MM en rechute en association au lenalidomide et à la dexaméthasone. Il s'agit du seul IP disponible par voie orale. Comparé au bortézomib, il présente une toxicité digestive plus importante mais sa neurotoxicité est moins sévère (49).

Ainsi, l'association de ces différents traitements permet d'agir à la fois sur les cellules tumorales mais aussi sur d'autres populations cellulaires (cellules immunitaires notamment...). Ceci montre que la connaissance et la compréhension de l'évolution des pathologies cancéreuses ne doit pas se concentrer uniquement sur les cellules tumorales elles même. En effet, si les évènements cytogénétiques jouent un rôle majeur dans l'oncogénèse, le pronostic et les phénomènes de rechute, les différents éléments entourant les cellules tumorales ont aussi un rôle clé. Ces derniers constituent ce que l'on appelle le microenvironnement tumoral ou stroma. Celui-ci interagit de façon étroite avec les cellules tumorales et constitue un partenaire majeur dans l'évolution de la maladie.



II. Le microenvironnement tumoral.

1) *Définition du microenvironnement.*

Le microenvironnement est un milieu complexe composé d'un compartiment cellulaire et d'un compartiment non cellulaire. Ce dernier est composé d'une matrice extracellulaire formée de macromolécules formant un gel hydraté (acide hyaluronique, protéoglycannes), de protéines (collagène, fibronectines...) permettant l'adhésion des cellules et de facteurs solubles responsables de l'activation de diverses fonctions cellulaires. Les cellules tumorales adhèrent à la matrice extracellulaire via le syndecan 1 et le Very Late Antigen (VLA-4)(82).

Le compartiment cellulaire comprend des cellules hématopoïétiques (macrophages, lymphocytes) et non hématopoïétiques (cellules souches mésenchymateuses (MSCs), fibroblastes, cellules endothéliales). Dans le cas du myélome, on trouve aussi des ostéoclastes et des ostéoblastes (83).

La composition du microenvironnement est spécifique de sa localisation. De plus, celui-ci varie et a des rôles différents selon s'il contient des cellules tumorales ou des cellules saines. En effet, il a été montré que le stroma tumoral et les cellules qui le composent est différent du stroma sain. Ces différences portent sur la composition biochimique de la matrice extracellulaire, la composition en facteurs solubles et le comportement des cellules. En condition physiologique, le microenvironnement n'est pas favorable à l'expansion des cellules tumorales. Ainsi, des modifications de celui-ci sont nécessaires avant l'implantation des premières cellules cancéreuses.

2) *Rôles du microenvironnement dans la physiopathologie du myélome.*

En conditions physiologiques, le microenvironnement joue un rôle suppresseur de tumeur. Or, la modification de celui-ci induite par les cellules tumorales sous l'influence de plusieurs mécanismes lui donne des effets pro-oncogéniques.

1. Tumorigénèse et dissémination métastatique.

La tumorigénèse repose sur la survenue d'évènements oncogénétiques permettant la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. Ces évènements cytogénétiques impliquent l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur et l'activation d'oncogènes au sein de la cellule. Cependant, la constitution d'un microenvironnement adapté est indispensable pour la croissance tumorale. En 1889, Stephan Paget formule l'hypothèse du « seed and soil » selon laquelle la dissémination métastatique n'est pas aléatoire mais nécessite une compatibilité entre la cellule tumorale et l'organe cible. En effet, la graine

(seed) désignant la cellule souche tumorale, initiatrice de la tumeur, doit trouver un organe permissif (soil) lui permettant de s'implanter et de proliférer (84).

Dans le cas du myélome, la dissémination des plasmocytes tumoraux sur d'autres sites médullaires implique une circulation sanguine continue de ces cellules. L'implantation des cellules myélomateuses au sein d'une nouvelle niche médullaire nécessite un ancrage de celles-ci aux cellules endothéliales via les sélectines puis une adhésion et une extravasation grâce aux intégrines exprimées par les plasmocytes (LFA-1 et VLA-4). L'implantation et la prolifération au sein de ce nouveau site nécessite un stroma pré-tumorisé. Ce phénomène a largement été montré dans le cas des cancers solides où les cellules tumorales sécrètent des cytokines induisant une modification du microenvironnement avant que les premières cellules tumorales ne s'y implantent. Cependant, celui-ci n'a pas encore été étudié dans le myélome.

2. Progression tumorale.

i. Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs).

Les MSCs présentent des caractéristiques de cellules souches par leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en plusieurs lignées cellulaires : chondrocytes, adipocytes, fibroblastes, ostéocytes...

Les cellules tumorales interagissent de façon directe avec les MSCs via VCAM-1 et VLA-4 (85) et de façon indirecte par sécrétion de facteurs solubles responsables de l'activation ou de l'inhibition de certaines fonctions cellulaires. Le rôle des MSCs dans la dissémination tumorale a été montré dans de nombreux cancers solides comme les cancers ovariens (86), mammaires et prostatiques (87).

Le comportement de ces cellules est directement influencé par les cellules tumorales pour qu'elles répondent à leurs propres besoins. Ainsi, des études montrent notamment que les MSCs issues de patients atteints de MM diffèrent de celles issues de patients sains. Ces différences portent notamment sur les profils d'expression géniques développés par J. Corre et al. mais aussi par une sécrétion accrue de certaines cytokines (88–90). La liaison des plasmocytes tumoraux aux MSCs et la sécrétion d'interleukine 1 (IL-1) en grande quantité par les plasmocytes déclenche la production d'interleukine 6 (IL-6) par les MSCs. L'IL-6 est le principal facteur de croissance et de survie plasmocytaire et est aussi impliqué dans la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes (91). Il exerce ses effets par activation de la voie des MAP kinases (MAPK) et des PI3K/Akt (92). De plus, les interactions entre MSCs et cellules myélomateuses sont responsables de l'activation de la voie Notch dans les deux

types de cellules, déclenchant aussi la production d'IL-6 et aboutissant à une boucle d'activation. Il existe d'autres facteurs de croissance sécrétés par les MSCs et impliqués dans la prolifération tumorale. C'est le cas de l'Insuline Like Growth Factor 1 (IGF-1) qui agit en activant les voies MAPK et PI3K/Akt (85) ou du GDF-15 (Growth Differentiation Factor) (93) (Figure 26).

T. Hideshima et al. 2002.

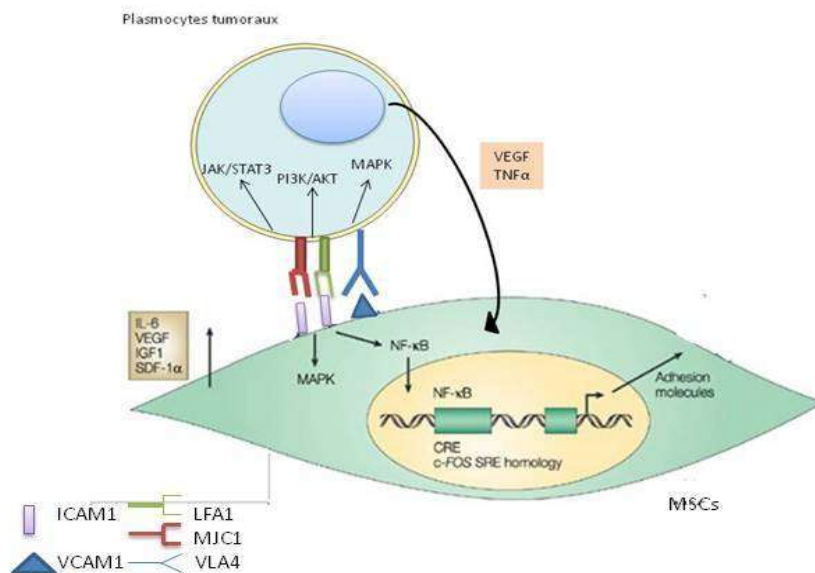


Figure 26 : Modes d'interactions entre plasmocytes tumoraux et MSCs.

ii. Ostéoclastes et ostéoblastes.

Les cellules myélomateuses, grâce à leurs interactions avec les MSCs, vont aussi contribuer à une modification de l'équilibre entre activités ostéoclastique et ostéoblastique. En effet, comme vu précédemment, les plasmocytes tumoraux stimulent l'axe RANK/RANKL augmentant ainsi l'activité ostéoclastique.

De plus, les MSCs jouent un rôle dans la perturbation de cet équilibre. Celles-ci, au contact des cellules myélomateuses, sécrètent les RANKL et d'autres facteurs pro-ostéoclastiques comme le MIP-1α et diminuent la libération d'ostéoprotégérine. De plus, sous l'influence des plasmocytes, les MSCs vont sécréter des facteurs inhibant la différenciation ostéoblastique et des facteurs anti ostéoblastiques (DKK, IL-3, TGF-β) (Figure 27) (29).

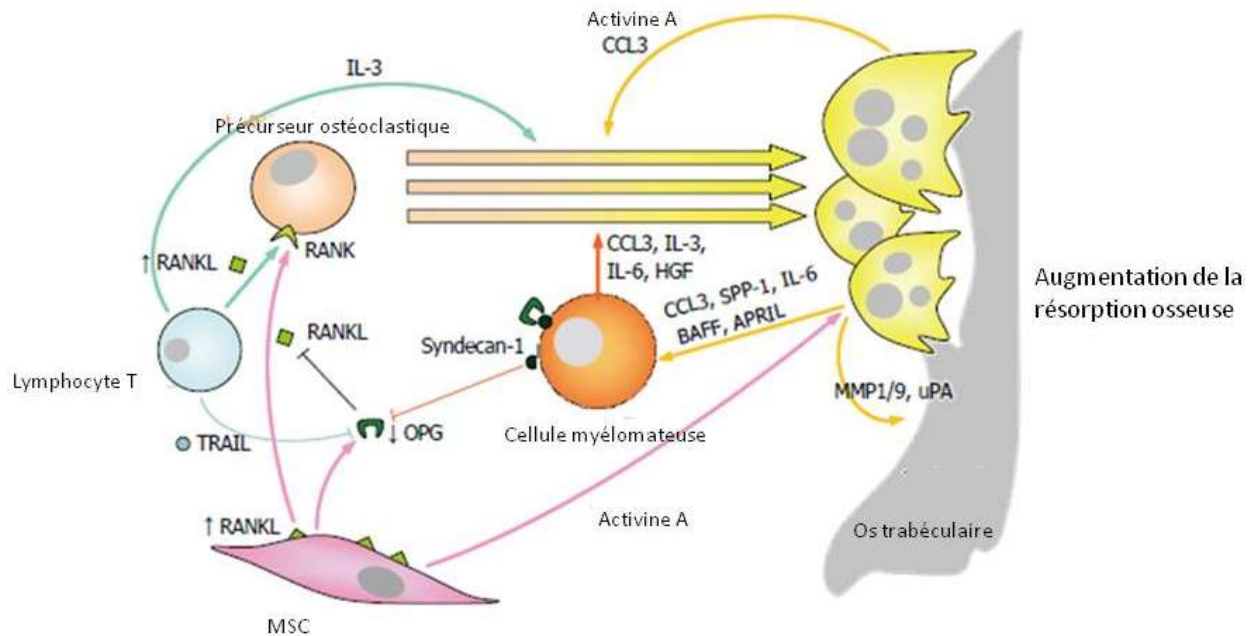


Figure 27 : Rôle des MSCs dans les perturbations osseuses observées.

Les ostéoblastes, par une augmentation de sécrétion d'IL-6 induite par les plasmocytes tumoraux, contribuent aussi à la progression tumorale (94).

Ainsi, l'augmentation de l'activité ostéoclastocytaire induite par les cellules tumorales contribue à l'augmentation de la masse tumorale.

iii. Néoangiogénèse.

La néoangiogénèse est un marqueur de progression tumorale. En effet, des études sur des prélèvements de moelle osseuse issus de patients montrent que l'activité néoangiogénique révélée par la mesure de la densité micro-vasculaire était plus importante chez les patients atteints de MM symptomatique par rapport au stade MGUS.

Celle-ci est médiée par plusieurs facteurs de croissance dont le plus connu est le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Celui-ci est sécrété par les plasmocytes tumoraux sous l'influence de l'IL-6 sécrétée par les MSCs.

On trouve aussi d'autres facteurs proangiogéniques comme le FGF et les métalloprotéinases (MMP). Ces dernières sont sécrétées à la fois par les cellules myélomateuses, les MSCs et les cellules endothéliales. Elles permettent la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et donc le passage des cellules tumorales dans la circulation sanguine. De plus, elles

libèrent d'autres facteurs proangiogéniques contenus dans la MEC et interviennent dans la résorption osseuse en recrutant les ostéoclastes et en participant à la dégradation de la trame osseuse (95).

iv. Chimiorésistance.

Les MSCs peuvent favoriser la résistance aux traitements des plasmocytes tumoraux par activation de diverses voies de signalisation. Tout d'abord, la sécrétion d'IL-6 entraîne une activation de la voie JAK/STAT3 au sein des cellules tumorales et donc une augmentation de l'expression des protéines antiapoptotiques Bcl2. L'expression de ces protéines débouche sur une résistance aux corticoïdes (92)

De plus, des phénomènes d'échappement au bortezomib ont été observés. En effet, les MSCs sont responsables d'une activation de la voie NF-κB au sein des plasmocytes tumoraux de façon indépendante au protéasome (aggrésomes...). Ainsi, les inhibiteurs du protéasome perdent leur effet cytotoxique sur les cellules tumorales (96,97)

Par ailleurs, le GDF-15, produit par les MSCs, induit une augmentation de la résistance aux traitements couramment employés contre le myélome (melphalan, bortezomib et lenalidomide). Cette augmentation de la survie cellulaire se fait par une phosphorylation d'Akt qui active la voie des PI3K. L'activation de cette voie induit une inhibition de l'apoptose et une activation de la prolifération cellulaire. De plus, il a été montré que le taux plasmatique de GDF-15 augmentait au fur et à mesure de la progression de la maladie et qu'il était corrélé à une baisse de la survie des patients (93)

3) Etude du microenvironnement tumoral.

L'ensemble de ces données montre l'importance du microenvironnement dans la physiopathologie du myélome et l'intérêt de l'étudier de façon approfondie. En effet, les mécanismes permettant d'expliquer la transformation du stroma normal en stroma tumoral sont encore peu connus. Des hypothèses suggèrent une sécrétion de cytokines par les cellules tumorales aboutissant à une modification de celui-ci ou bien une migration des MSCs transformées vers d'autres sites médullaires afin de préparer l'implantation de nouveaux foyers tumoraux. L'étude de ce dernier mécanisme nécessite de tracer les MSCs *in-vivo* chez les modèles murins de façon à pouvoir les suivre tout au long de la maladie. De plus, l'étude des traitements ciblant les MSCs et leurs interactions avec les plasmocytes nécessite aussi leur visualisation *in-vivo*. Il est donc important d'utiliser des modèles permettant de reproduire la maladie telle qu'elle est observée chez l'homme.

i. Les modèles murins.

Afin de reproduire le plus fidèlement possible la maladie sur les modèles murins, il est important de pouvoir humaniser et tumorer le microenvironnement de la souris afin de permettre l'implantation et la croissance des plasmocytes tumoraux. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser des modèles fortement immunodéprimés.

Les souris SCID et NOD (Non Obese Diabetic)/SCID sont caractérisées par l'absence de lymphocytes B et T fonctionnels. Les NOD/SCID sont aussi dépourvues de fractions libres du complément et de lymphocytes NK. L'injection sous cutanée de lignées de cellules myéloïdes permet l'implantation et la prolifération tumorale mais on n'observe pas de dissémination métastatique contrairement à l'injection intraveineuse (98). En revanche, ces modèles sont moins adaptés lorsque l'on utilise des cellules primaires de patients puisque on observe un développement tumoral dans 70% des cas. De plus, les localisations métastatiques observées (poumons, reins) ne correspondent pas forcément à celles observées chez l'homme (99).

Les souris SCID-hu sont des souris SCID dans lesquelles sont implantés des os fœtaux humains afin d'obtenir un microenvironnement totalement humanisé. Les plasmocytes tumoraux issus de lignées ou de patients sont ensuite directement inoculés dans ces implants. L'utilisation de ce modèle permet d'obtenir de meilleurs taux de prise que lorsque celles-ci sont injectées par voie intraveineuse. On observe une implantation des cellules tumorales exclusivement au niveau du site d'injection puis l'apparition de lésions osseuses et de néovascularisations indiquant l'infiltration médullaire par les plasmocytes. Cependant, ce modèle n'est pas disponible en France en raison de l'utilisation d'os fœtaux humains.

Pour pallier à cette indisponibilité, des souris NSG (NOD/SCID gamma IL-2) sont utilisées. Il s'agit de modèles dépourvus d'immunité adaptative (lymphocytes B et T) mais aussi de lymphocytes NK. Par ailleurs, elles présentent un défaut d'activité du complément, de l'immunité innée et une délétion au niveau de la chaîne gamma du récepteur à l'IL-2, interleukine impliquée dans l'activation des lymphocytes T, B et NK. L'utilisation de lignées de cellules myélomateuses a permis une implantation tumorale au sein de la moelle osseuse dans plus de 75% des cas. En outre, l'utilisation de la voie intra-tibiale directement dans la moelle osseuse permet une prise tumorale dans 100% des cas. On observe ensuite la formation de lésions osseuses et les mêmes signes cliniques que chez l'homme (99). Dans le but d'humaniser le microenvironnement tumoral de la souris et de mimer la maladie telle qu'elle est observée chez l'homme, il est nécessaire d'injecter conjointement en intra-tibial des plasmocytes tumoraux et des MSCs tous deux issus de patients. L'humanisation du stroma permettra d'étudier les effets de celui-ci sur la progression tumorale.

ii. *Les techniques d'imagerie moléculaires in-vivo.*

L'imagerie métabolique permet d'évaluer le fonctionnement d'un organe en visualisant un phénomène biologique ou biochimique se produisant au sein d'une cellule (métabolisme, captation d'un substrat...).

La visualisation des MSCs et des plasmocytes en direct sur le modèle murin impose l'utilisation de méthodes d'imagerie *in-vivo*. Il existe deux types d'imagerie : l'imagerie optique et l'imagerie nucléaire.

- **L'imagerie optique.**

L'imagerie optique repose sur la détection de photons lumineux émis par les cellules que l'on souhaite étudier. Pour cela, il est nécessaire de marquer les cellules à l'aide d'une sonde ou d'une protéine émettrice d'un photon lumineux ou fluorescent. Afin d'induire l'expression de cette protéine, des gènes rapporteurs sont utilisés. Ces gènes sont transduits dans le génome des cellules à tracer en utilisant un vecteur (plasmide, virus...). Après intégration du transgène au sein du génome de la cellule, celui-ci sera transcrit puis traduit permettant ainsi la synthèse de la protéine. La synthèse de la protéine pourra être visualisée grâce à des caméras qui détectent les photons émis par la protéine contenue dans les cellules.

Deux types de gènes rapporteurs sont couramment utilisés dans ce type d'imagerie. Tout d'abord, des gènes codant pour des fluorophores. Après excitation de ces derniers par un faisceau monochromatique de longueur d'onde donnée, le fluorophore émet à son tour un faisceau monochromatique de longueur d'onde supérieure. Les fluorophores les plus connus sont la GFP (Green Fluorescent Protein), le FITC (Fluorescein Isothiocyanate), protéines émettrices d'une fluorescence verte, la CFP (Cyan Fluorescent Protein), protéine émettrice d'une fluorescence bleue.



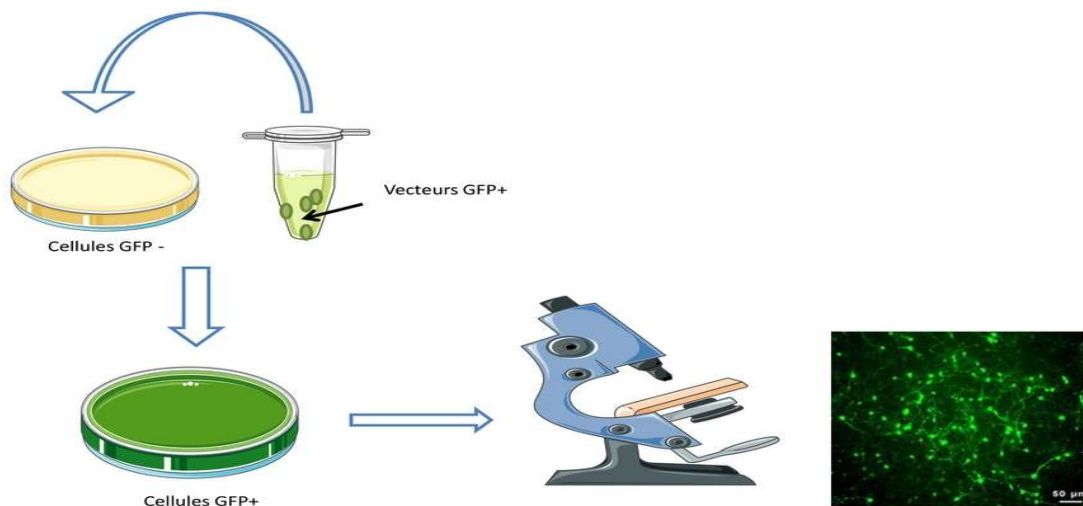


Figure 28: Transfection de gènes rapporteurs (GFP) puis visualisation *in-vitro* après excitation de ces derniers par microscopie de fluorescence (longueur d'onde d'excitation 488 nm ; longueur d'onde d'émission : 507 nm).

Les cellules ainsi modifiées sont inoculées au petit animal puis visualisées grâce une caméra optique qui émet la lumière excitatrice et détecte les photons émis par le fluorophore après excitation.

Tassone et al. ; 2013

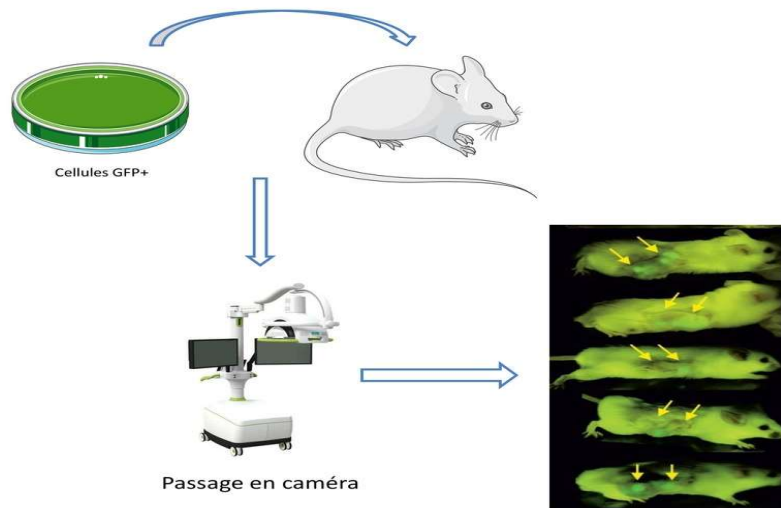


Figure 29 : Imagerie optique *in-vivo* de plasmocytes tumoraux inoculés au sein des implants d'os fœtaux humains chez des souris SCID-hu grâce à la GFP.

L'utilisation de l'imagerie par GFP permet la visualisation *in-vivo* des plasmocytes tumoraux après injection à des souris SCID hu (100). Par ailleurs l'utilisation d'anticorps anti CD38 marqués par un fluorophore a permis la visualisation *in-vivo* des plasmocytes tumoraux chez des souris NSG. Ces derniers ont été injectés en intra-tibial et par voie intraveineuse (101).

L'utilisation de ce type d'anticorps présente l'avantage de ne pas nécessiter de modification génétique des plasmocytes avant leur inoculation aux modèles murins.

La deuxième méthode d'imagerie optique est la bioluminescence. Il s'agit de l'émission de lumière suite à des réactions enzymatiques au sein de certains organismes vivants (vers à soie, méduses...). La plus connue est celle se produisant au sein de la luciole (*Photynus Pyralis*). Elle fait intervenir un substrat, la luciférine, dont l'oxydation en présence d'ATP est catalysée par une enzyme, la luciférase. Cette réaction aboutit à la formation d'oxyluciférine qui se trouve dans un état électronique excité. Le retour dans son état fondamental se fait par émission d'un photon lumineux (Figure 30).

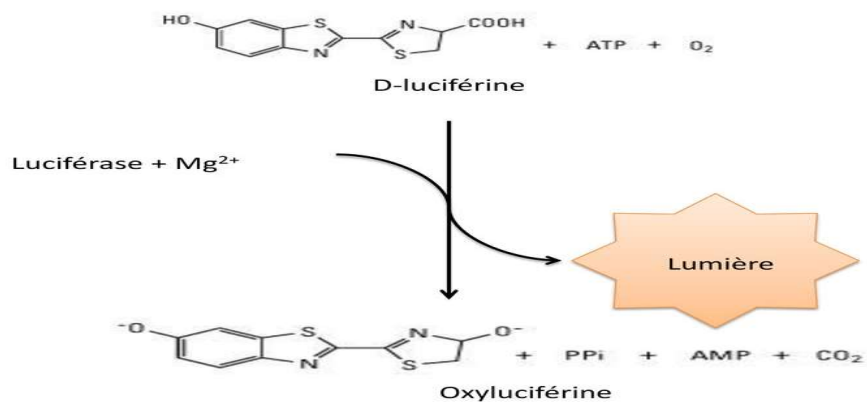


Figure 30 : Principe de la bioluminescence.

L'utilisation de cette imagerie chez le petit animal nécessite en premier lieu de greffer des cellules génétiquement modifiées exprimant le gène de la luciférase. L'observation de ces cellules se fait après injection de la luciférine à la souris juste avant l'acquisition des images (Figure 31) (102).

S. Riedel et al. 2012.

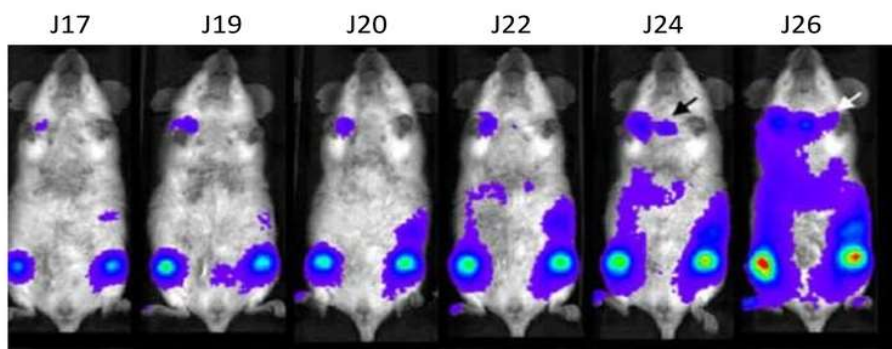


Figure 31 : Visualisation *in-vivo* de lignées de cellules myélomateuses après injection à des modèles murins par voie intraveineuse.

L'utilisation de l'imagerie optique comme technique d'imagerie moléculaire pour le suivi *in-vivo* des plasmocytes tumoraux est une technique de choix en raison de sa très grande sensibilité (10^{-15} à 10^{-17} μM). Cependant, elle n'a pas encore permis de suivre avec précision les MSCs injectées à des modèles murins. En effet, les plasmocytes sont décelables environ 15 jours après leur injection IV et 35 à 40 jours après leur inoculation intra-tibiale. Cette latence montre une nécessité de croissance tumorale importante avant qu'une détection ne soit possible surtout en intra-tibial. Ceci s'explique par d'importants phénomènes d'atténuation des photons lumineux par les tissus vivants (Tableau 6). En effet, les photons détectés par la caméra ne représentent qu'une infime proportion de ceux réellement émis. Or, les MSCs sont dotées d'une capacité de prolifération très limitée rendant leur détection par l'imagerie optique compliquée.

- **Imagerie nucléaire.**

L'imagerie nucléaire repose sur la détection de rayonnement ionisant émis par un isotope radioactif. Il s'agit d'une technique d'imagerie couramment utilisée en clinique. L'utilisation radioéléments chez l'homme impose de respecter certaines conditions. Tout d'abord, l'énergie doit être suffisante pour permettre une détection par la tête de détection des γ caméras, la période (temps au bout duquel la moitié des noyaux sont désintégrés) suffisamment longue pour permettre l'analyse de l'organe et assez courte pour pouvoir être éliminé facilement par l'organisme et éviter une trop forte irradiation.

En fonction du mode de désintégration de l'isotope, deux sortes d'imageries sont disponibles : la Tomographie par Emission MonoPhotonique (TEMP) qui repose sur la détection de rayonnement gamma (γ) et la Tomographie par Emissions de Positons (TEP) pour les émetteurs β^+ (Tableau 6).

Ces techniques permettent d'observer le métabolisme d'un traceur au sein d'un organe. Pour cela, un vecteur, dont le métabolisme est spécifique de l'organe ou de la pathologie à visualiser, est injecté par voie IV généralement. Celui-ci est associé à un isotope radioactif pour former un médicament radiopharmaceutique (MRP). L'organe devient alors émetteur de rayons ionisants qui seront détectés par gamma caméra. On parle d'imagerie d'émission par opposition aux méthodes conventionnelles radiologiques où le faisceau traverse le patient. On obtient alors une cartographie de la radioactivité au sein de l'organe cible qui donne les informations nécessaires pour évaluer le fonctionnement ou le métabolisme de l'organe.

Parmi les scintigraphies couramment réalisées en clinique, on trouve les scintigraphies osseuses où le vecteur est un biphosphonate marqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$. On trouve aussi les scintigraphies thyroïdiennes à l'iode 123 qui joue à la fois le rôle de vecteur et d'émetteur (Figure 32).



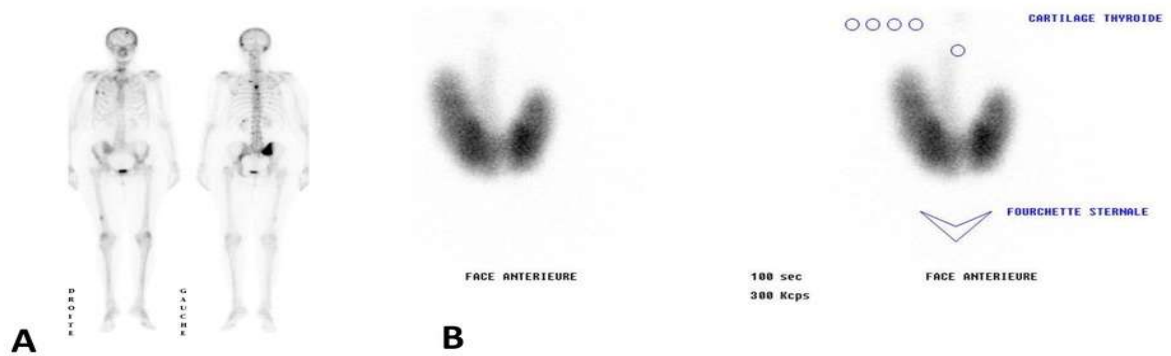


Figure 32 : (A) exemple de scintigraphie osseuse (B) exemple de scintigraphie thyroïdienne.

La TEMP repose sur le même principe que la scintigraphie mais l'image obtenue est différente. En effet, plusieurs caméras tournent autour du patient ce qui permet une acquisition volumique de l'organe d'intérêt et donc une image en 3D.

La TEP utilise des vecteurs marqués avec un isotope émetteur β^+ . En se désintégrant, le noyau va émettre un positon. Celui-ci va s'annihiler après un très court parcours (de l'ordre du mm) avec un électron du milieu. Il en résulte la formation de deux photons γ de 511 keV émis dans la même direction avec des sens opposés. Des capteurs placés tout autour du patient détectent les photons arrivant en coïncidence, c'est-à-dire ceux qui arrivent en même temps (Figure 33). L'ensemble des photons détectés permet de reconstituer la distribution du vecteur au sein de l'organe.

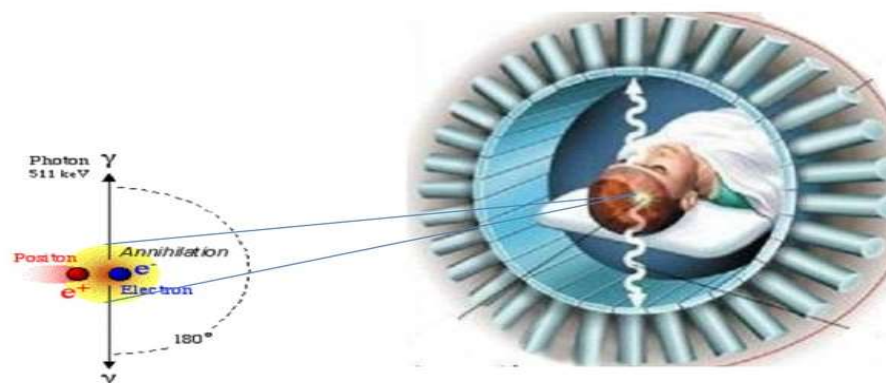


Figure 33 : Principe général de la TEP.

Les principales applications de la TEP sont en cancérologie avec le fluorodésoxuglucose (FDG) marqué au fluor 18 [^{18}F]-FDG. Il s'agit d'un analogue de glucose dans lequel le radical hydroxyle est remplacé par du ^{18}F . Il est métabolisé préférentiellement par les cellules très consommatrices de glucose, à savoir les cellules cancéreuses notamment. Le [^{18}F]-FDG est

métabolisé par une hexokinase cellulaire en [¹⁸F]-FDG-6-phosphate. Ce composé ne peut plus être métabolisé en raison de l'absence du radical hydroxyle substitué par le fluor 18. Celui-ci va donc se retrouver séquestré dans la cellule. L'image observée par TEP donne donc une répartition fidèle du [¹⁸F]-FDG au sein de l'organisme.

Il s'agit de méthodes très sensibles (10^{-14} 10^{-15} μM) qui ont en plus l'avantage d'être disponibles pour un usage clinique. De plus, contrairement aux imageries optiques, les rayonnements gamma détectés interagissent très peu avec la matière et ne sont donc pas atténués par les tissus vivants. Ceci permet donc une détection des cellules situées en profondeur dans l'organisme mais aussi une analyse quantitative (Tableau 6). Ainsi, l'intensité du signal détectée par la caméra est directement proportionnelle à l'intensité du rayonnement émis (103).



Techniques	Traceur	Signal détecté	Avantages	Inconvénients	Sensibilité (μM)	Résolution
TEP	Molécule radiomarquée	Positron	Haute sensibilité Imagerie 3D	Radioactivité Un seul radionucléide détectable Bruit de fond	10^{-15}	1-2 mm
TEMP	Molécule radiomarquée	Rayon gamma	Plusieurs radionucléides détectables donc plusieurs phénomènes moléculaires visualisables en même temps. Imagerie 3D	Radioactivité Bruit de fond	10^{-14}	1-2 mm
Scanner	Aucun	Rayon X	Rapide	Faible résolution sur tissus fins	10^{-6}	50 μm
Imagerie optique	Protéine fluorescente ou enzyme.	Lumière	Simple Faible bruit de fond (bioluminescence)	Faible pénétration tissulaire. Pas d'imagerie 3D	10^{-15} à 10^{-17} (bioluminescence) 10^{-12} (fluorescence)	2-5 mm

Tableau 6 : Comparaison des différentes techniques d'imagerie disponibles chez le petit animal.



L'imagerie nucléaire semble donc être une alternative intéressante pour la visualisation *in-vivo* des MSCs après injection de celles-ci en intra-tibial. Pour cela, elles doivent être capables d'accumuler et séquestrer un radiotracer. Des gènes rapporteurs peuvent aussi être utilisés de façon à induire une captation spécifique de ce traceur par les cellules à visualiser.

Parmi eux, on trouve le Sodium Iodide Symporter (NIS). Ce gène code pour une protéine transmembranaire située à la membrane basolatérale des cellules folliculaires de la thyroïde, de la muqueuse gastrique, des glandes salivaires et mammaires. Elle intervient dans la synthèse des hormones thyroïdiennes en permettant le transport actif d'un ion iodure vers les follicules thyroïdiens en échange d'un ion sodium (Figure 34).

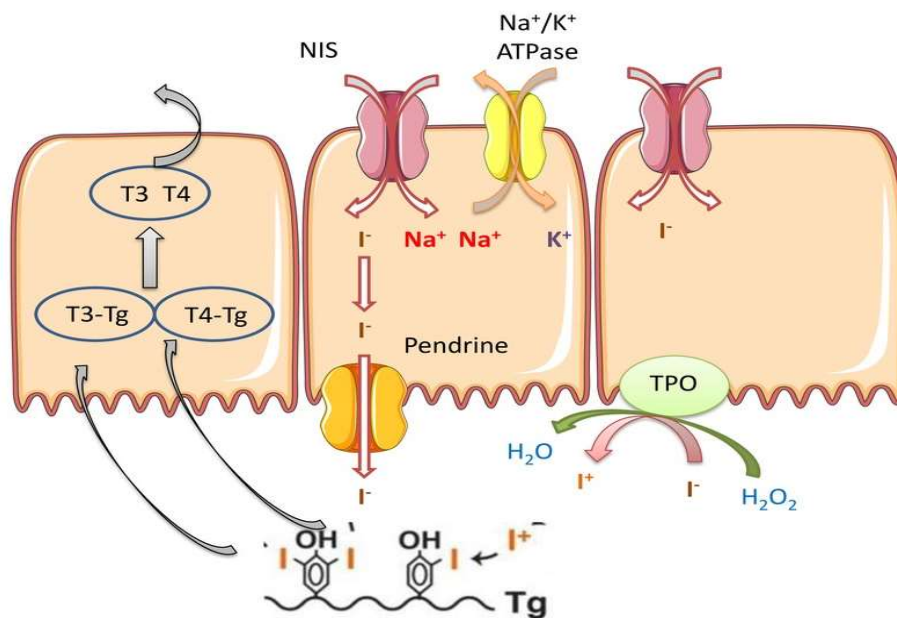


Figure 34 : Schéma du fonctionnement de NIS au sein des cellules thyroïdiennes.

Cette protéine est aussi capable de transporter les isotopes radioactifs de l'iode (^{123}I , ^{131}I ...) mais aussi d'autres molécules comme le pertechnétate de sodium (NaTcO_4) permettant la réalisation des scintigraphies thyroïdiennes. De plus sa capacité à capter l'iode 131 permet de l'utiliser à des fins thérapeutiques telles que le traitement des cancers thyroïdiens. Par ailleurs, cette protéine a été utilisée pour de nombreuses applications expérimentales en tant que gène rapporteur pour le suivi *in-vivo* de cellules tumorales et leur dissémination métastatique sur des modèles murins ainsi que pour l'évaluation de certains traitements (104).

Ainsi, l'ensemble de ces applications font de NIS un gène bien connu qui peut être utilisé pour visualiser les MSCs par imagerie nucléaire chez les modèles murins. Afin d'induire l'expression de NIS au sein des cellules, il est nécessaire d'utiliser des vecteurs pour intégrer le transgène au sein de leur génome de façon efficace et reproductible.

iii. Les vecteurs utilisés pour la modification génique.

L'un des aspects essentiels du transfert de gènes est la vectorisation de l'ADN au sein de la cellule. En effet, l'ADN est une molécule anionique de grande taille dont le passage au travers des membranes biologiques est impossible (membrane chargée négativement). Il est donc indispensable d'utiliser des techniques permettant de lui faire passer la membrane plasmique puis la membrane nucléaire de la cellule cible.

Le vecteur doit être capable de s'associer aux cellules de façon spécifique ou non, pénétrer dans le cytoplasme de la cellule par endocytose notamment, et permettre l'entrée de l'ADN dans le noyau (Figure 35).

JY. Legendre et al. 1996.

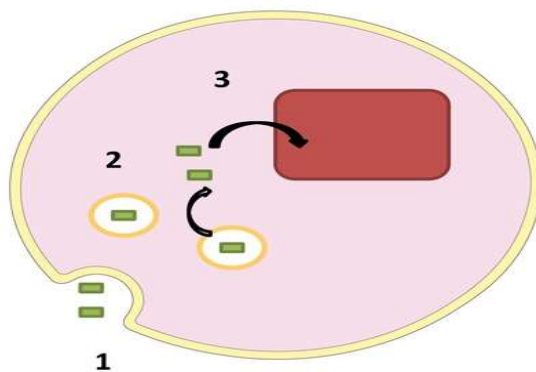


Figure 35 : Etapes nécessaires pour le transfert génique dans une cellule hôte. (1) Fusion avec la membrane cellulaire (endocytose), (2) résistance aux mécanismes de dégradation intracellulaires (lysosome) et libération de l'ADN dans le cytoplasme (3) passage dans le noyau cellulaire.

Les vecteurs utilisés pour la transfection génique sont classés en deux catégories : les vecteurs viraux et non viraux. L'ensemble de ces vecteurs doivent permettre d'assurer l'intégrité de la cellule cible mais aussi un maximum d'innocuité en cas d'usage chez l'homme. De nombreuses applications de thérapies géniques utilisant ces vecteurs ont déjà été testées chez l'homme dans les années 90 notamment dans le traitement des déficits immunitaires combinés sévères, de la phénylcétonurie et d'autres maladies autosomiques dominantes.

Le gène d'intérêt est intégré au sein d'un plasmide. Le plasmide est un ADN circulaire distinct de l'ADN chromosomique et capable de répllication autonome. Sa présence n'est pas

essentielle à la survie de la cellule. Chaque plasmide contient une séquence d'origine de la réplication ou *ori* qui lui permet d'être dupliqué de façon indépendante de l'ADN chromosomique en utilisant les enzymes de la cellule hôte.

- **Les vecteurs non viraux.**

Ils comprennent les techniques physiques telles que l'électroporation, le bombardement de particules (gene gun), la magnétofection et les techniques chimiques (liposomes, particules chargées) et chimiques. Ces techniques restent moins efficaces que les vecteurs viraux mais elles sont pauvres en risque immunogène et permettent le transfert de gènes de grande taille.

- **Les méthodes physiques.**

Les méthodes physiques consistent à utiliser des procédés permettant de créer des pores au niveau des membranes cellulaires ou bien d'augmenter leur perméabilité de façon transitoire afin d'introduire l'ADN dans le milieu intracellulaire. Il s'agit de méthodes sûres mais dont l'efficacité reste limitée.

ADN nu : L'injection directe d'ADN au sein des cellules peut être envisageable pour de très petits gènes (2 à 19 kb). Celle-ci a été utilisée pour l'injection au sein de cellules hépatiques ou de cellules musculaires. Les rendements obtenus sont très faibles (1% environ) mais peuvent être augmentées par de multiples injections. Même si cette méthode reste l'une des plus sûres et compte parmi les plus simples, elle reste peu utilisée en raison des très faibles rendements de transfection (105). De plus, cette technique impose une injection cellule par cellule et du matériel spécialisé la rendant difficilement utilisable (106).

Canon à ADN : appelé aussi « gene gun ». Les cellules cibles sont bombardées par des microparticules (1 à 3µm) d'or ou de tungstène recouvertes de l'ADN à transférer. Ces particules sont propulsées grâce à des gaz à haute pression afin de permettre la pénétration des particules au sein des cellules cibles. Elle offre de meilleurs rendements mais ses applications restent limitées à l'immunisation au niveau des tissus superficiels comme la peau ou les muscles (107).

Electrotransfert : technique d'électroporation qui vise à déstabiliser temporairement les membranes cellulaires en utilisant des électrodes génératrices d'un courant électrique. Les plasmides situés aux environs des cellules cibles peuvent ainsi pénétrer facilement au travers des membranes. Les rendements obtenus sont meilleurs mais cette technique est traumatisante pour la cellule, pour l'organe traité mais aussi pour l'ADN en raison des forts courants appliqués.

Ultrasons : le passage des ultrasons dans un milieu aqueux génère des bulles contenant l'ADN. Ces dernières éclatent puis libèrent une grande quantité d'énergie générant des nanopores au sein des membranes cellulaires et permettant le passage de l'ADN dans les cellules. L'efficacité de cette méthode reste cependant limitée surtout pour des transferts *in-vivo*.

Injection hydrodynamique : cette technique consiste à injecter très rapidement en intraveineux ou intraartériel de grandes quantités de liquide contenant l'ADN d'intérêt. Cette forte pression permet une pénétration de l'ADN dans les cellules préférentiellement hépatiques et musculaires. Elle permet d'obtenir de bien meilleurs rendements que les autres techniques non virales.

Méthodes magnétiques : des particules d'oxyde de fer sont chargées de l'ADN à transférer puis placées dans un champ magnétique. Celles-ci se retrouvent en contact avec les membranes cellulaires ce qui favorise les mécanismes d'endocytose. L'efficacité de cette méthode est modeste et présente des risques de toxicité en raison de l'accumulation des particules de fer dans les cellules.

Irradiation par laser : Un faisceau laser est focalisé sur les cellules cibles entraînant une perméabilisation locale des membranes grâce à un effet thermique et permettant le passage de l'ADN. L'utilisation d'un laser femtoseconde utilisant des impulsions très faibles (de l'ordre de 10^{-15} secondes) a donné de bons résultats pour des transferts géniques *in-vivo* mais cette technique nécessite des installations très coûteuses.

L'ensemble de ces techniques ont montré des résultats encourageants dans de nombreuses études précliniques mais leur efficacité reste très modeste. De plus, le traumatisme qu'elles génèrent sur les cellules et les tissus les rend peu adaptées pour des lignées fragiles comme les MSCs et une éventuelle utilisation en clinique (106).

- Les méthodes chimiques.

Les vecteurs chimiques sont caractérisés par une faible toxicité permettant une faible altération de la membrane cellulaire et l'absence de risque immunogène. De plus, l'ADN est intégré dans un complexe le protégeant des enzymes cellulaires pouvant l'altérer. En revanche, les rendements de transfection obtenus sont beaucoup plus faibles.

Les liposomes : ce sont des vésicules lipidiques permettant d'encapsuler un principe actif. Ils sont notamment très utilisés en cosmétologie mais peuvent aussi encapsuler des molécules d'ADN. Celui-ci est alors enfermé dans des vésicules unilamellaires de grandes



tailles. Cependant, les faibles rendements obtenus ont conduit à améliorer la composition de ces derniers. En effet, après pénétration dans la cellule par endocytose, la majorité d'entre eux se retrouvent dégradés après fusion avec les lysosomes. Des protéines fusiogènes ont donc été incorporées aux liposomes de façon à protéger l'ADN des systèmes de dégradation intracellulaires en permettant leur fusion à l'endosome puis la libération de l'ADN dans le milieu intracellulaire (Figure 36) (108).

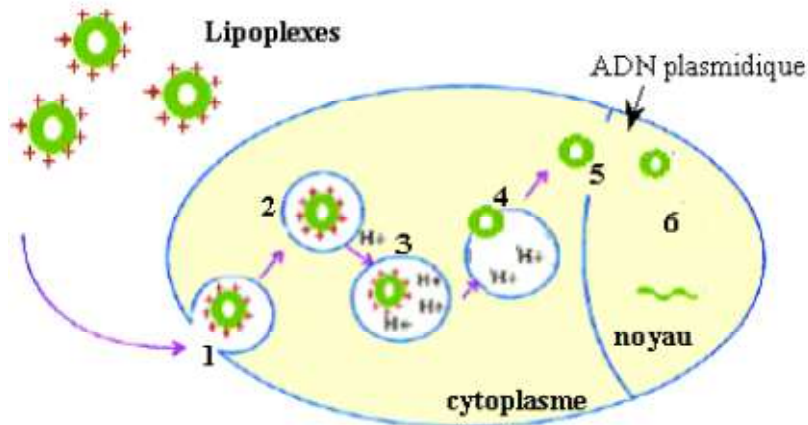


Figure 36 : Mécanisme d'intégration des liposomes dans le génome des cellules hôtes.

De plus, l'adhésion du liposome à la membrane cellulaire est une étape difficile en raison des forces de répulsion électrostatiques. Afin d'améliorer l'adhésion avec les cellules cibles, des lipides cationiques ont été élaborés. Ceux-ci sont constitués d'une tête polaire cationique qui interagit avec l'ADN, d'une partie hydrophobe avec une ou deux chaînes aliphatiques ou d'un dérivé du cholestérol et d'un bras espaceur entre les deux parties précédentes. L'association entre les parties cationique et lipidique forme un lipoplexe. Le premier lipide cationique produit est le DOTMA mais de nombreux autres ont été mis au point (Tableau 7). Ainsi, la partie cationique permet une meilleure affinité avec la membrane cellulaire chargée négativement.



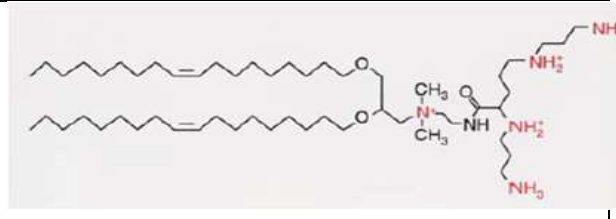
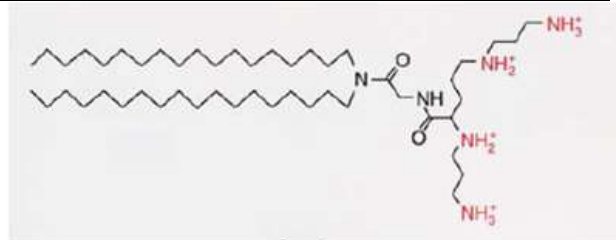
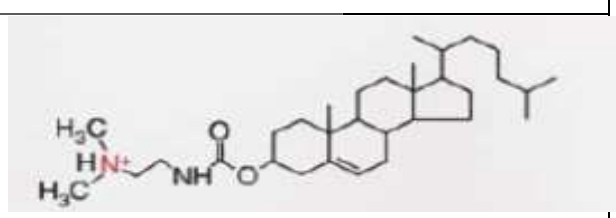
Noms abrégés	Noms entiers	Structures chimiques
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]N-N-triméthylammonium.	
DDAB	Bromure de diméthyl dioctadécyl ammonium	
DOSPA	Trifluoroacétate de dioleocyl-N-(3-sperminecarboxamido)éthyl-N,N diméthyl-1-propanominium.	
DOGS	Dioctadécylamidoglycylspermine.	
DC-chol	Diméthylaminoéthane carbamoyl cholestérol	

Tableau 7 : Exemples de lipides cationiques utilisés comme vecteur de transfert génique. On distingue les lipides monocationiques (DOTMA, les lipides polycationiques (DOGS) et les dérivés du cholestérol (DC-chol).

Les lipides polycationiques sont plus efficaces en raison de l'affinité plus élevée avec les membranes cellulaires.

D'autres améliorations ont aussi été testées afin d'augmenter la demi-vie des liposomes en ajoutant des groupements pégylés ou en dirigeant spécifiquement les liposomes vers un type cellulaire en ajoutant des ligands de récepteurs exprimés par les cellules à cibler (109).

Complexes peptidiques : ces techniques reposent sur la condensation de l'ADN plasmidique avec un polycation couplé à un ligand capable de reconnaître et de se lier à un récepteur spécifique d'une population cellulaire. La liaison du récepteur au ligand entraîne l'endocytose du complexe.

Les premiers à être utilisés sont les polylysines (PLL) auxquelles ont été greffés des éléments viraux (hémagglutinine) permettant d'améliorer leur pénétration au sein des

cellules et la libération de l'ADN dans le cytoplasme. Grâce à leurs nombreuses charges positives, ces polymères forment des complexes stables avec l'ADN et permettent un transport efficace au sein de la cellule.

De nouveaux polymères plus efficaces ont été mis au point. C'est le cas par exemple de la polyéthylèneimine (PEI). En effet, son efficacité semble être liée à la présence d'un grand nombre de fonction amines protonables permettant de piéger les protons présents dans les endosomes et donc de protéger l'ADN contre l'augmentation de l'acidité. De plus, ces polymères contribueraient à augmenter la pression osmotique au sein des endosomes, favorisant leur rupture et la libération de l'ADN dans le cytoplasme. Cependant, les PEI ont aussi une toxicité marquée pour les cellules *in-vivo* rendant leur utilisation difficile (105). Ainsi, les vecteurs chimiques peuvent être produits de façon simple et reproductible. De plus, leur immunogénicité est faible. La seule réponse immunitaire qu'ils déclenchent a pour conséquence leur destruction mais elle ne présente aucun danger pour l'organisme hôte. En revanche, la stabilité du complexe ADN-vecteur est très difficile à garantir et le rendement de transfection reste nettement inférieur à celui obtenu par les vecteurs viraux.

- **Les vecteurs viraux :**

Les vecteurs viraux constituent à ce jour les moyens les plus efficaces pour la modification génique. Ce sont des analogues de virus dont les génomes ont été largement modifiés afin de leur retirer tout pouvoir répliatif une fois inoculés à l'organisme hôte et ainsi éliminer tout risque infectieux. De plus, des modifications des récepteurs présents à la surface virale ont permis de mettre au point des vecteurs spécifiquement dirigés contre un type de cellule (110). De nombreuses applications cliniques ont été testées avec ce type de vecteurs mais leur utilisation n'est pas sans risque. En effet, certains d'entre eux présentent un fort potentiel immunogène pouvant déclencher des réactions inflammatoires aiguës et d'autres peuvent induire des transformations cellulaires du fait de l'intégration de leur génome au sein de celui de la cellule cible. Ainsi, des modifications de ces vecteurs sont actuellement à l'étude afin de leur retirer tout potentiel immunogène ou transformant.

- Vecteurs rétroviraux.

Les vecteurs rétroviraux font partie des plus utilisés pour le transfert génique. Ils transduisent spécifiquement les cellules en division en passant par les pores mitotiques. Il s'agit de vecteurs intégratifs c'est-à-dire que le transgène, une fois intégré au génome de la cellule hôte, se transmet aux cellules filles (105). Cette caractéristique en fait un vecteur adapté pour le traitement de maladies génétiques comme les Déficits Immunitaires Combinés Sévères (DICS) (111). Cependant, des complications sévères ont été décelées quelques



années après traitement de certains patients par ces vecteurs. En effet, il a été montré que les rétrovirus pouvaient s'intégrer au voisinage du proto-oncogène LMO2 aboutissant à une surexpression de ce dernier et au développement de Leucémies Aigües Lymphoïdes (112). De plus, ces vecteurs sont peu adaptés pour transfecter des cellules qui ne se divisent pas ou peu comme les lignées de cellules souches (MSCs notamment).

- Adénovirus et associés.

Les vecteurs adénoviraux peuvent quant à eux transduire de façon équivalente les cellules qui se divisent ou non. De plus, leur faible spécificité d'hôte leur permet de transduire un large spectre de tissus. En revanche, il ne s'agit pas de vecteurs intégratifs ce qui implique que le transgène ne se transmet pas à toutes les cellules descendantes. De ce fait, son expression au cours du temps est transitoire mais leur risque génotoxique est faible (105). Cependant, le risque de réaction immunitaire associé à ces vecteurs est important. En effet, plusieurs cas de réactions inflammatoires aigües ont été décrits et certains ont été mortels (113).

Des vecteurs adénoviraux modifiés appelés Adeno-Associated Vectors (AAV) sont aussi disponibles. Leur génome a été modifié de façon à les rendre moins immunogènes et moins pathogènes. De plus, ils permettent une expression plus longue du transgène au sein de la cellule hôte. Néanmoins, ce sont des vecteurs difficiles à produire qui ne permettent de transfecter que des gènes de petite taille (105).

- Herpes Simplex Virus (HSV).

On utilise des HSV modifiés de façon à ce qu'aucune nouvelle particule virale ne soit produite après infection et intégration au génome de la cellule hôte. Leur tropisme pour les cellules nerveuses en fait un excellent vecteur pour la transduction de cellules du système nerveux central (105).

- Lentivirus.

Le lentivirus est un virus de la famille des *Retroviridae* dont le génome est constitué d'ARN simple brin positif. Ceux-ci contiennent une rétrotranscriptase qui permet la synthèse de l'ADN correspondant au génome viral. L'intégration de celui-ci au génome de la cellule hôte se fait grâce à l'intégrase contenue dans les particules virales. Le génome essentiel des lentivirus comprend des gènes de structure codant pour les protéines de l'enveloppe virale (*env*), la capsid (*gag*), les enzymes (*pol*), des gènes codant pour des protéines régulatrices *tat* (transactivator of transcription), *rev* (regulation of expression of viral proteins) et des



gènes dits accessoires *vif* (virion infectivity factor), *vpr* (viral protein r), *vpu* (viral protein u) *nef* (negative regulatory factor) qui codent pour les protéines du même nom (Figures 37 et 38).

T. Sakuma et al. 2012

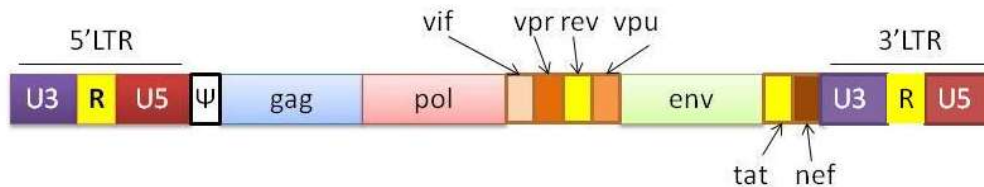


Figure 37 : Schéma du génome viral. La séquence LTR (Long Terminal Repeat) active la transcription de l'ARN viral et participe à son intégration dans le génome de la cellule hôte. U3 joue le rôle de promoteur, R active la polyadénylation de l'ARN côté 3'. La séquence d'empaquetage Ψ permet l'encapsidation des nouveaux ARN viraux dans les particules virales produites.

Gunilla B et al. 2008 (114)

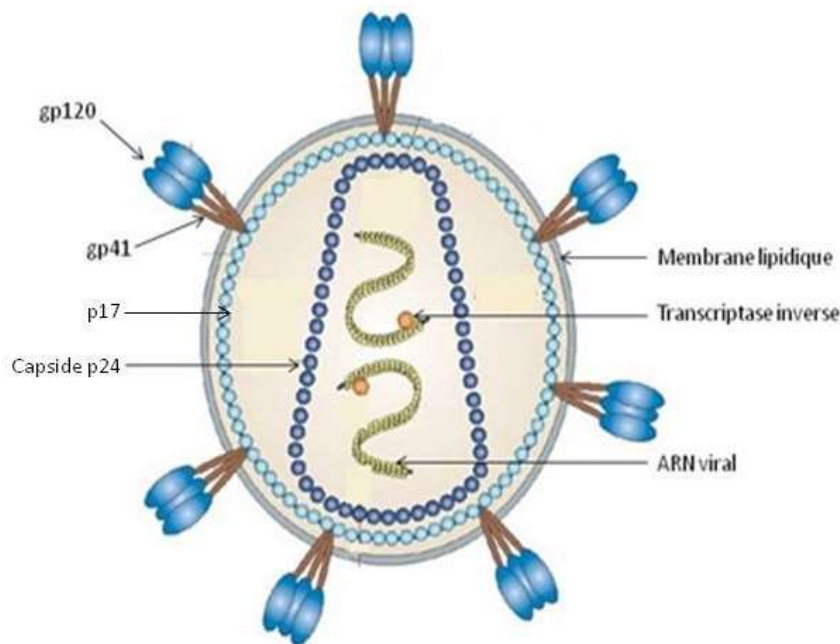


Figure 38 : Schéma d'une particule virale de lentivirus. Les protéines d'enveloppe gp120 et gp 41 sont codées par le gène *env*, les protéines de la capside interne et externes sont codées par le gène *gag* et les enzymes virales par le gène *pol*.

Le gène *env* permet aux lentivirus de transduire les cellules cibles par interaction avec le récepteur CD4 présent sur ces dernières. Cette sélectivité d'interaction rend leur pouvoir infectieux limité et les rendements de transduction obtenus sont faibles. Pour pallier à ce problème, *env* a été remplacé par le VSV-G (vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G). Son utilisation élargit considérablement les cibles des vecteurs lentiviraux en en faisant des vecteurs amphotropes et permet une nette augmentation de l'efficacité de transduction

(115). Contrairement aux autres virus de sa famille, le lentivirus peut aussi bien transduire des cellules en division que des cellules quiescentes. Ceci est un avantage non négligeable dans la mesure où les MSCs sont des cellules qui se divisent peu.

Ces vecteurs ont subi de nombreuses modifications afin de supprimer leur pouvoir réplicatif et limiter les risques d'oncogénèse. En effet, les vecteurs lentiviraux de 1^{ère} génération sont élaborés à partir de trois plasmides. L'un d'eux contient les gènes *gag* et *pol* et constitue le plasmide d'emballage. Le deuxième porte le gène *env* et le troisième le transgène. Seul ce dernier porte la séquence d'emballage Ψ de façon à générer des particules virales portant uniquement le transgène dans le génome et pas les autres gènes viraux (Figure 40). Les virus ainsi générés sont donc dépourvus de leur pouvoir réplicatif limitant les risques d'infection (Figure 39).

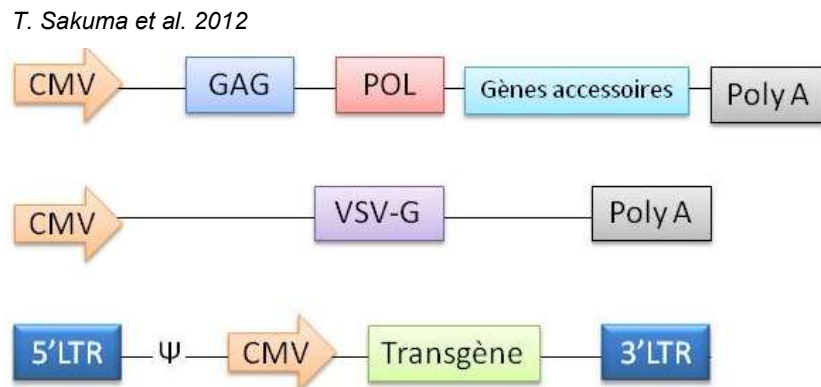


Figure 39 : Plasmides pour vecteurs lentiviraux de première génération. Seul le plasmide portant le transgène porte la séquence d'emballage et les séquences LTR. Les gènes sont placés sous le contrôle d'un fort promoteur viral : CMV.

Ensuite, les vecteurs de deuxième génération sont élaborés selon le même principe mais sont dépourvus des gènes accessoires *vif*, *vpu*, *vpr* et *nef* limitant davantage leur pouvoir réplicatif et leur pouvoir pathogène.

Les lentivirus vecteurs de troisième génération sont délétés pour une partie de leur séquence U3 de la région 3'LTR réduisant les risques d'activation de gènes cellulaires adjacents (oncogènes). De plus, la partie U3 de 5'LTR a été remplacée par un fort promoteur viral (CMV) de façon à les rendre indépendants de *tat*, réduisant ainsi les risques de production de virus recombinants. Leur utilisation pour transduire les MSCs avec NIS paraît être un procédé intéressant en raison de leur capacité à transduire des cellules quiescentes, de leur bonne sécurité d'emploi et de la possibilité de créer des lignées cellulaires stables exprimant le transgène (116).

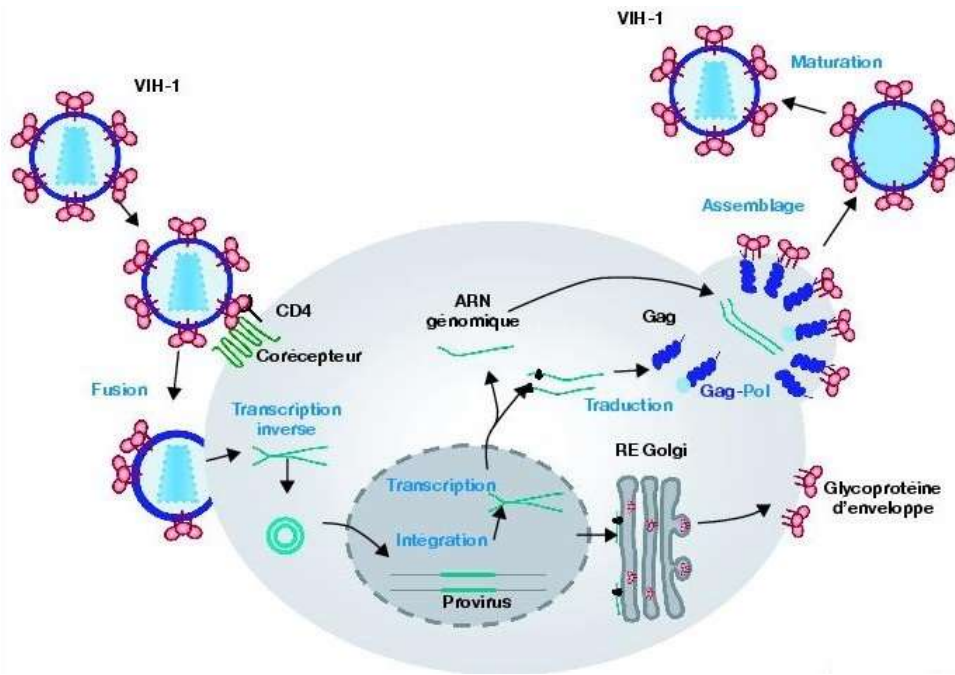


Figure 40 : Schéma du cycle viral des lentivirus (H. Bauby et al). L'adhésion des virus aux récepteurs CD4 se fait grâce aux protéines d'enveloppe. L'ARN est rétrotranscrit dans le cytoplasme puis intégré au génome de la cellule hôte grâce à l'intégrase. Les protéines codées par *env* sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique.

Ainsi, la connaissance du microenvironnement constitue un enjeu important dans la compréhension de l'évolution de la maladie au fil des traitements. Celle-ci nécessite de pouvoir visualiser les principales cellules composant le stroma tumoral à savoir les MSCs afin de comprendre son évolution au cours de la maladie et l'influence des différents traitements.



3^e PARTIE : Imagerie *in-vivo* du microenvironnement tumoral

L'objectif de ce travail était de développer une technique d'imagerie nucléaire *in-vivo* des MSCs ainsi que d'évaluer sa faisabilité sur des modèles murins. La première étape consistait à mettre au point des vecteurs lentiviraux afin de transduire le gène NIS au sein de MSCs issues de patients. Dans un second temps, nous avons évalué *in-vitro* puis *in-vivo* l'expression et la fonctionnalité du transgène au sein des MSCs.

I. Matériels et Méthodes

1) *Lignées cellulaires, réactifs.*

1. Culture cellulaire.

Les cellules HEK293T (cellules embryonnaires de rein humaines) ont été utilisées pour la production des particules virales à partir des plasmides décrits ci-dessous. Celles-ci ont été mises en culture dans une flask de 75cm² à une densité de 1.5×10^6 cellules par boîte et incubées à 37°C, sous une atmosphère à 5% de CO₂ et en condition normoxique de façon à leur permettre d'adhérer au support. Le milieu de culture est du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza) auquel ont été ajoutés 10% de sérum de veau fœtal, 1% de L-Glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine (Sigma Aldrich). Les cellules sont maintenues en pression de sélection en ajoutant du G418 (Généticine) (InvivoGen) à 4µg/mL dans le milieu de culture.

Les MSCs issues de patients sont obtenues auprès de l'Unité Génomique du Myélome de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse. Celles-ci sont cultivées dans une flask de 75 cm² à une densité de 1 à 1.5×10^6 cellules par boîte en atmosphère à 5% de CO₂, en conditions normoxiques et à 37°C en incubateur. Le milieu utilisé est du Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco) avec 10 % de sérum fœtal de veau (Sigma Aldrich) et 0.5% de ciprofloxacine (milieu MES).

2. Plasmides.

Les plasmides d'emballage (gag-pol : p891), d'enveloppe virale (pMD2.G) et codant la GFP (pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE) ont été obtenus auprès du laboratoire TronoLab (Suisse).

Le vecteur codant pour le gène d'intérêt NIS a été généré par les équipes 17 et 18 du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT) (projet collaboratif Refbio). L'ADNc codant NIS a été acheté à la société Plasmid (USA), amplifié par PCR puis inséré dans le plasmide donneur pCR4-TOPO (Invitrogen) dans le site multiple de clonage. L'ADN cloné est flanqué de deux sites de restriction pour l'enzyme EcoRI. Cet enzyme a donc été utilisé pour extraire l'ADNc correspondant à NIS et pour l'insérer dans le plasmide receveur pLVX-TetOn-Puro (Clontech Laboratories) après linéarisation de ce dernier par digestion enzymatique.

L'ensemble des enzymes de restriction et les tampons de digestion utilisés sont obtenus auprès du fournisseur New England Bio Labs.

2) Production des vecteurs viraux.

4 plasmides ont été utilisés pour produire 2 types de particules virales :

- Virus NIS+ :
 - pLVX-TetOne-Puro-NIS Vector (figure 41a)
 - Packaging vector: gag-pol p891. (Figures 41c)
 - Plasmide d'enveloppe virale : pMD2.G (Figure 41d)

- Virus GFP+ :
 - pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE (Figure 41b)
 - Packaging vector: p891.
 - Plasmide d'enveloppe virale pMD2-G.



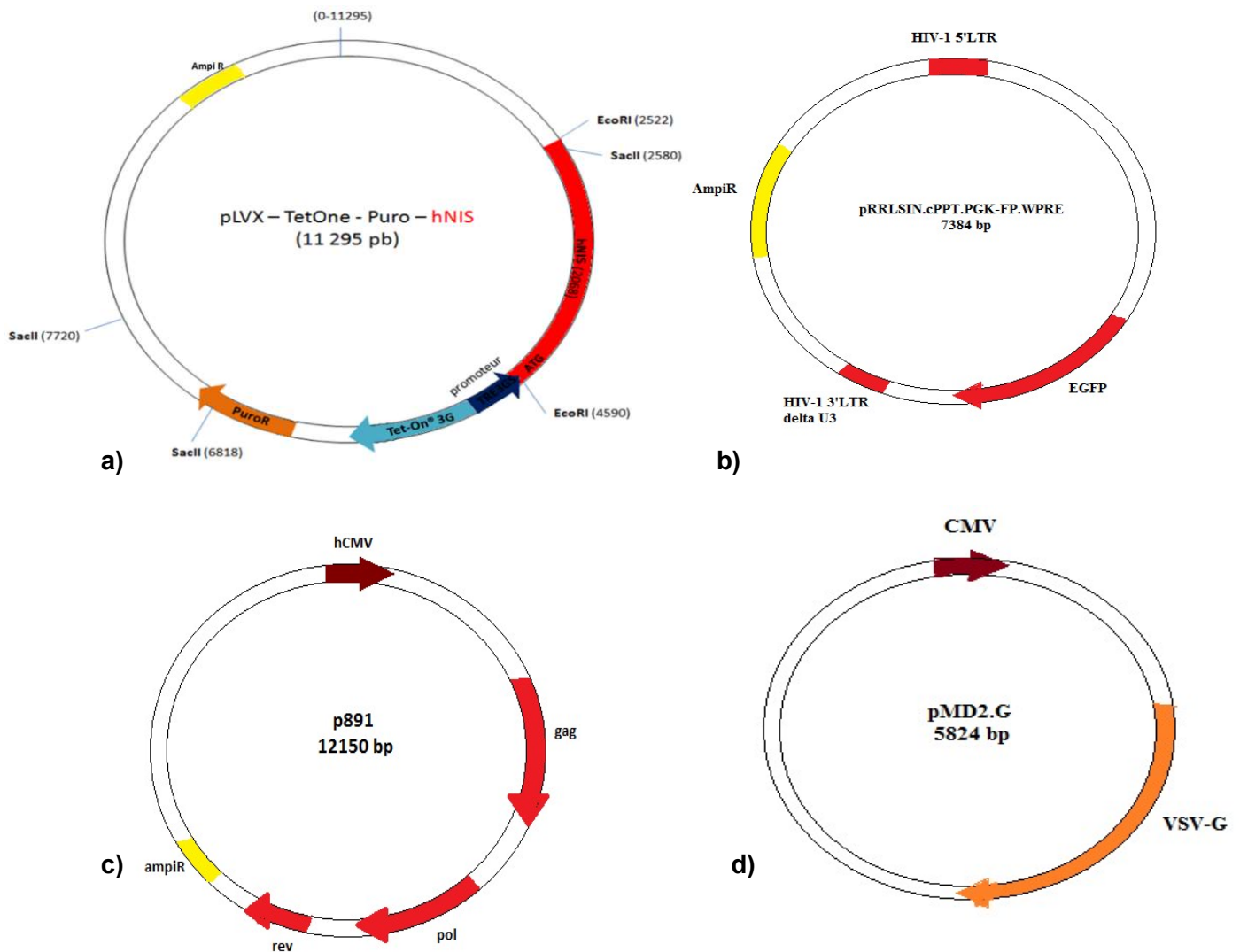


Figure 41: Cartographie des plasmides utilisés. (a) Plasmide codant le gène NIS inducible à la doxycycline. Tet-On 3G est un promoteur CMV sur lequel ont été ajoutés des séquences Tet operator. La sélection des bactéries transformées par le plasmide se fait par le gène de résistance à l'ampicilline (ampR) et celle des cellules transduites par le gène de sélection à la puromycine (PuroR). Les sites de restriction pour EcoRI et SacII sont identifiés. (b) Plasmide codant la GFP avec gène de sélection ampR. La région 3' LTR est déléguée de sa séquence U3. (c) Packaging vector p891 avec gène de sélection ampR. (d) Plasmide d'enveloppe pMD2.G codant pour la protéine d'enveloppe VSV-G.

3. Génération et purification des plasmides.

Des bactéries d'*Escherichia Coli* GT115 ChemiComp (InvivoGen) chimiocompétentes sont transformées après ajout du plasmide codant pour NIS et incubation pendant 30 minutes dans la glace puis 30 secondes à 42°C et à nouveau dans la glace pendant 1 à 2 minutes. Celles-ci sont ensuite déposées dans du milieu de culture liquide sans ampicilline pendant une heure (Fast Media Liquid Amp, InvivoGen). Le mélange est ensuite réparti sur une gélose contenant du milieu de culture avec ampicilline (Fast Media Amp Agar, InvivoGen) et

laissé à incuber durant 12 heures à 37°C pour permettre la réplication et la sélection du plasmide. A l'issue des 12 heures, la gélose contenant les colonies est conservée à 4°C.

Une colonie de bactéries est prélevée et placée dans 200 mL de milieu Fast Media Liquid Amp. Le mélange est conservé à 37°C pendant 12 heures pour permettre la prolifération des bactéries. L'ADN plasmidique contenu dans les clones sélectionnés par l'ampicilline est extrait par l'utilisation du kit Endo Free Plasmid Maxi Kit (Quiagen®). La concentration en ADN plasmidique extrait et purifié est mesurée par spectrométrie UV 260 nm (Nanodrop®).

Afin de vérifier l'intégrité du vecteur de NIS, deux digestions du plasmide ont été réalisées :

- Digestion de 1µg de pLVX-TetOne-Puro par 1µg d'EcoRI afin de vérifier l'insertion de NIS dans le vecteur. La réaction a été réalisée en présence de tampon 3.1. pendant 12 heures à 37°C.
- Digestion par 1µg de SacII en présence de tampon CutSmart pour vérifier que NIS ait été inséré dans le bon sens. La réaction se fait à 37°C pendant 12 heures.

Les fragments obtenus sont séparés selon leur taille par migration à travers un gel d'agarose 1% (100 mL de TBE 0.5X + 1g d'agarose) puis révélés par ajout du fluorophore SYBR Green (Bio-Rad) qui se fixe aux acides nucléiques (longueur d'onde d'excitation : 488nm, longueur d'onde d'émission : 525nm).

4. Production virale.

Les cellules HEK293T en culture ont été utilisées pour produire les virus. Celles-ci sont transfectées avec le mélange de plasmides suivant :

- 20 µg de plasmide d'intérêt (pLVX-TetOne-Puro-NIS ou pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE)
- 15 µg de packaging vector (p891)
- 6 µg de plasmide d'enveloppe (pMD2.G)

Une solution de chlorure de calcium 1M ainsi que de l'eau distillée stérile sont ajoutées au mélange. L'ensemble est versé goutte à goutte dans une solution de HBS, laissé à température ambiante pendant 12 minutes et introduit dans la flask de 293T. Après deux jours d'incubation à 37°C et un changement de milieu de culture à 24 heures, le surnageant contenant les virus produits est filtré à travers une membrane de 0.45 µm en acétate de cellulose Whatman (GE Healthcare). A 24h d'incubation, les cellules transfectées avec le plasmide codant pour la GFP sont visualisées au microscope à fluorescence (longueur d'onde d'excitation : 490nm, longueur d'onde d'émission : 520 nm).



5. Transduction des MSCs.

Des MSCs en culture et ayant adhéré au support sont utilisées. Le milieu MES est retiré de la flask. Une solution de polybrène (6mg/mL) ainsi que le surnageant viral obtenu lors de l'étape précédente sont ajoutés. Après 4h à 37°C, le surnageant est retiré de la flask et du milieu MES est réintroduit. L'ensemble est mis à incuber 48 heures à 37°C.

La capacité des MSCs à exprimer le transgène peut être évaluée par analyse des cellules transduites avec la GFP en microscopie à fluorescence dès 24h aux mêmes longueurs d'onde d'excitation que précédemment.

Le gène NIS est transduit aux MSCs de la même façon.

6. Tri cellulaire.

Les MSCs transfectées avec la GFP sont triées par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Les cellules sont lavées au PBS (Sigma Aldrich), traitées par trypsine et laissées à 37°C pendant 5 minutes. Elles sont ensuite reprises dans du MES avant d'être centrifugées à 1200 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est récupéré dans du PBS puis l'ensemble est recentrifugé dans les mêmes conditions. Le culot obtenu est à nouveau repris dans du PBS + 10% de SVF.

L'efficacité de transfection est déterminée en mesurant le pourcentage de cellules exprimant la GFP.

Les cellules transduites avec le vecteur portant le gène NIS sont sélectionnées en ajoutant 75 µg de puromycine (InvivoGen) par mL de milieu de culture incubées pendant 72 heures minimum.

3) *Test d'expression de NIS par RTq-PCR.*

Des MSCs transduites avec NIS et cultivées dans des flask sont utilisées. Celles-ci sont traitées avec de la doxycycline pendant 16 heures. L'ARN cellulaire est extrait à l'aide du kit d'extraction RNeasy Mini kit (Quiagen). Ensuite, celui-ci est rétrotranscrit en ADN complémentaire grâce à une rétrotranscriptase iScript (Bio-Rad). Celui-ci sera hybridé avec des amorces correspondant à des fragments du gène NIS (Sigma-Aldrich). Les amorces sens utilisées sont CCCAGACCAGTACATGCC (position 1178 à 1265; Tm = 59°C) et GCCCAGACCAGTACATGC (position 1177 à 1410 ; Tm = 59°C). Les amorces anti-sens utilisées sont CTGTAAGCACAGGCCAGGAA et GGCCGATCCGTAGATGAGTG. Les séquences ainsi hybridées sont amplifiées par une Taq polymérase (Bio-Rad). Le SYBR Green est utilisé afin de quantifier les séquences amplifiées.

4) Test de fonctionnalité de NIS (captation in-vitro du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ par les MSCs transfectées avec NIS).

Les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits à une densité de 10^5 cellules par puit, avec milieu MES et traitées par doxycycline. Celles-ci sont laissées à 37°C pendant 24h. Ensuite, les MSCs sont lavées au PBS puis du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (0.74MBq/mL) est ajouté avec du milieu de culture. L'ensemble est laissé à incuber pendant différents temps (0 à 2h). Après incubation, les cellules sont lavées trois fois au PBS et l'activité du surnageant (PBS+MES) est mesurée au compteur gamma Automatic gamma counter 1470 Wizard 3 (Perkin Elmer). Les cellules sont détachées par trypsine puis l'activité cellulaire est mesurée par le compteur gamma.

Un test d'inhibition est réalisé en ajoutant du perchlorate de sodium (NaClO_4) 50 μM au $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et au MES dès le début des incubations. L'activité des cellules et des surnageants est mesurée après les mêmes temps d'incubation.

5) Imagerie in-vivo sur le petit animal.

Des cultures de MSCs transduites avec NIS sont traitées à la doxycycline pendant 16 heures puis détachées par ajout de trypsine. Elles sont récupérées dans du PBS puis filtrées et centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris dans 10 μL de PBS. Les MSCs sont injectées en intra-tibial à des souris NSG préalablement conditionnées au busulfan (36 heures avant) et anesthésiées par injection intrapéritonéale de kétamine + xylazine. Trois souris ont reçu $5 \cdot 10^5$ cellules et trois ont reçu $1 \cdot 10^6$ cellules en intra-tibial. De la doxycycline per-os (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) est donnée aux souris jusqu'à leur passage en caméra. Deux cohortes de souris témoin ont été utilisées : une ayant reçu 10 μL de PBS intra-tibial et une ayant reçu $5 \cdot 10^5$ MSCs non activées par la doxycycline. Toutes les expérimentations animales ont été approuvées par le Comité d'Ethique d'Expérimentation animale du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (référence : CEEA-122 2014-25). Une imagerie précoce (24 heures après injection des MSCs) est réalisée. Les souris sont anesthésiées avec le même mélange anesthésique que précédemment. Le $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (1.85 MBq) est injecté par voie intraveineuse aux souris par la veine caudale. L'acquisition des images sur caméra TEMP (GE Healthcare) est réalisée 30 minutes après pendant 20 minutes. Les images sont ensuite traitées et reconstruites par un logiciel de reconstruction d'images (Xeleris fonctionnal imaging workstation). Les souris sont ensuite sacrifiées. L'humérus et le tibia de la patte injectée ainsi que celui la patte opposée sont récupérés afin de mesurer la radioactivité accumulée par compteur gamma.

II. Résultats.

1) *Génération des plasmides.*

Des souches d'*E. Coli* chimiocompétentes ont été transformées avec chaque plasmide nécessaire pour la production virale (pLVX-TetOn-Puro-NIS, p891, VSV-G, GFP), amplifiées et sélectionnées pendant 12 heures. L'ADN plasmidique est ensuite extrait et purifié. La concentration en ADN plasmidique obtenue est mesurée par spectrométrie UV :

- pLVX-TetOne-Puro-NIS: 1.4µg/µL.
- pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE: 0.75µg/µL.
- p891: 2µg/µL.
- pMD2.G: 1.35µg/µL.

Afin de vérifier l'intégrité du plasmide pLVX-TetOne-Puro-NIS, généré à partir d'un plasmide donneur (pCR4-TOPO), des digestions de celui-ci ont été effectuées. Deux enzymes de restriction ont été utilisées :

- Digestion par EcoRI sur deux sites (2522 et 4590). Deux fragments sont générés : 1 de 2068 paires de bases correspondant à l'insert NIS entouré des deux sites de restriction EcoRI et 1 de 9227 pdb correspondant au plasmide vide. (Figure 42).
- Digestion par SacII sur trois sites (2580 présent à l'intérieur de l'insert, 6818 et 7720). Trois fragments sont générés : 1 de 902 pdb, 1 de 4238 pdb et un de 6155 pdb. (Figure 42).

Après digestion par EcoRI, on constate la présence de deux brins correspondant aux tailles attendues. Les plasmides ont donc bien intégré l'insert. Après digestion par SacII, on obtient trois brins dont la taille correspond à celles attendues dans le cas d'une insertion dans le bon sens (codon initiateur ATG adjacent au promoteur en position 4590). En effet, une insertion dans le mauvais sens aurait décalé le site Sac II de l'insert en position 4532, générant des fragments de tailles différentes.

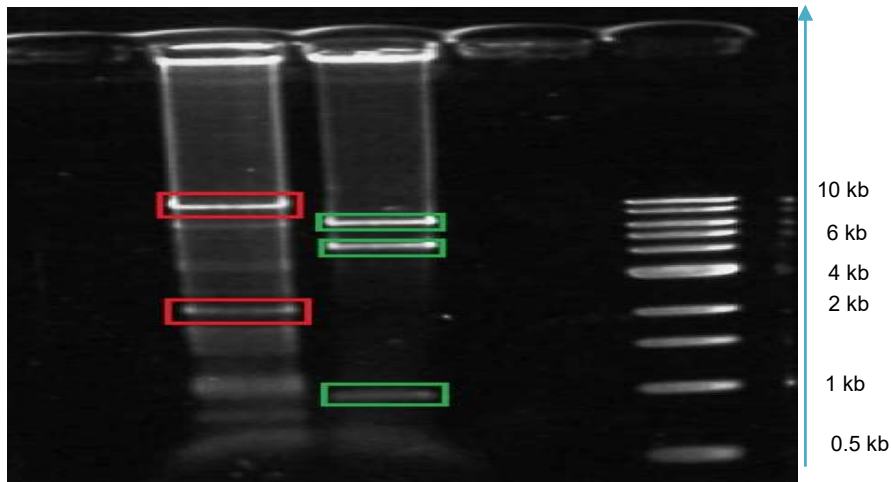


Figure 42: Profil de migration des fragments de pLVX-TetOne-Puro-NIS sur gel d'agarose 1% après digestion par EcoRI (rouge) et SacII (vert). A droite, marqueur de taille échelle 1Kb. Après digestion par EcoRI, on retrouve les deux fragments de 2068 pdb (insert NIS) et de 9227 pdb (pLVX-TetOne Puro). Après digestion par SacII, on retrouve les trois fragments de 902, 4238 et 6155 pdb.

2) *Production des particules virales.*

La capacité des cellules HEK293T à intégrer le plasmide a été évaluée pour celles qui ont été transduites avec les vecteurs codant pour la GFP. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence 24 heures après la transduction afin de visualiser la GFP au sein des cellules. La visualisation de fluorescence verte confirme que les HEK293T expriment le transgène. On constate que les cellules transfectées avec le plasmide codant pour la GFP sont visibles sous lumière blanche (Figure 43a) et par fluorescence (Figure 43b). En revanche, les cellules non transfectées ne sont visibles qu'en lumière blanche (Figure 43c) mais pas en microscopie de fluorescence (Figure 43d).

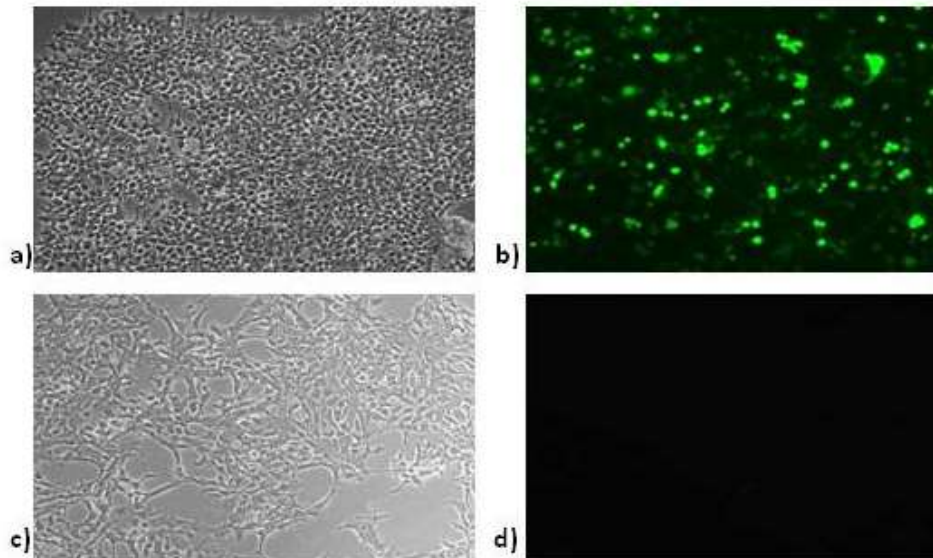


Figure 43: Visualisation des cellules HEK293T après transfection par le plasmide codant GFP en lumière blanche (a et c) et par microscopie de fluorescence par utilisation d'un filtre d'excitation à 490nm afin de sélectionner les radiations absorbées par le fluorochrome (b et d). Visualisation des cellules transfectées (a et b) et des cellules non transfectées (c et d).

Ces résultats montrent que seules les cellules transfectées par le plasmide sont capables d'exprimer la GFP.

La même expérience a été réalisée pour vérifier la capacité des MSCs à exprimer le transgène après transduction par les vecteurs viraux. Les cellules transduites avec les vecteurs lentiviraux obtenu avec le plasmide codant pour la GFP sont visibles sous lumière blanche (Figure 44a) et par fluorescence (Figure 44b). En revanche, celles non transduites ne sont visibles qu'en lumière blanche (figure 44c) mais pas en microscopie de fluorescence (figure 44d).

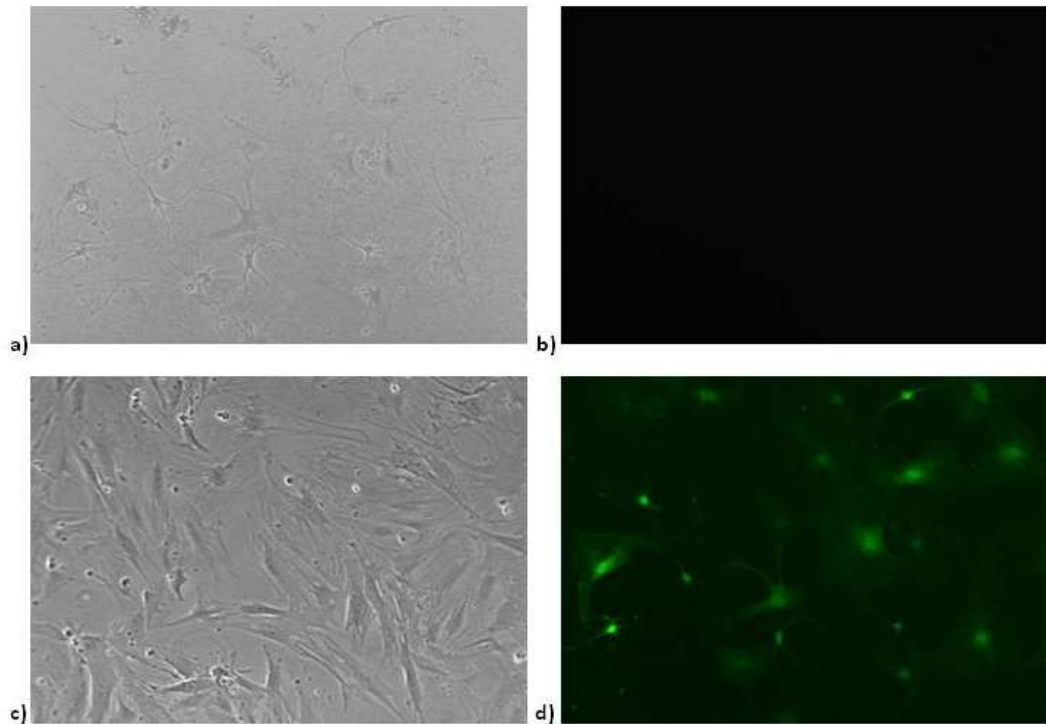


Figure 44: Visualisation des MSCs après transduction par le plasmide codant la GFP en lumière blanche (a et c) et par microscopie de fluorescence en utilisant le filtre d'excitation à 490 nm (b et d). Visualisation des MSCs non transduites (a et b) et des MSCs transduites (c et d).

Ainsi, seules les MSCs transduites expriment la GFP. Ces résultats montrent que la méthode utilisée permet une production de particules virales satisfaisante pour modifier de façon efficace et reproductible les MSCs. De plus, ces résultats confirment la possibilité de transduire ces cellules par l'utilisation de vecteurs lentiviraux.

Les MSCs ont été triées par cytométrie de flux 24 heures après transfection par les particules virales et les pourcentages de cellules exprimant la GFP ont été mesurés (figures 45a à 45c). On obtient une efficacité moyenne de 81.6% (n = 5 flask testées).

Les MSCs transduites par pLVX-TetOne-Puro-NIS sont sélectionnées en ajoutant de la puromycine dans le milieu de culture pendant 72 heures puis visualisées par microscopie. Des cellules non transfectées sont traitées de la même façon (figures 45d et 45e). On observe que seules les cellules transduites survivent en présence de puromycine.

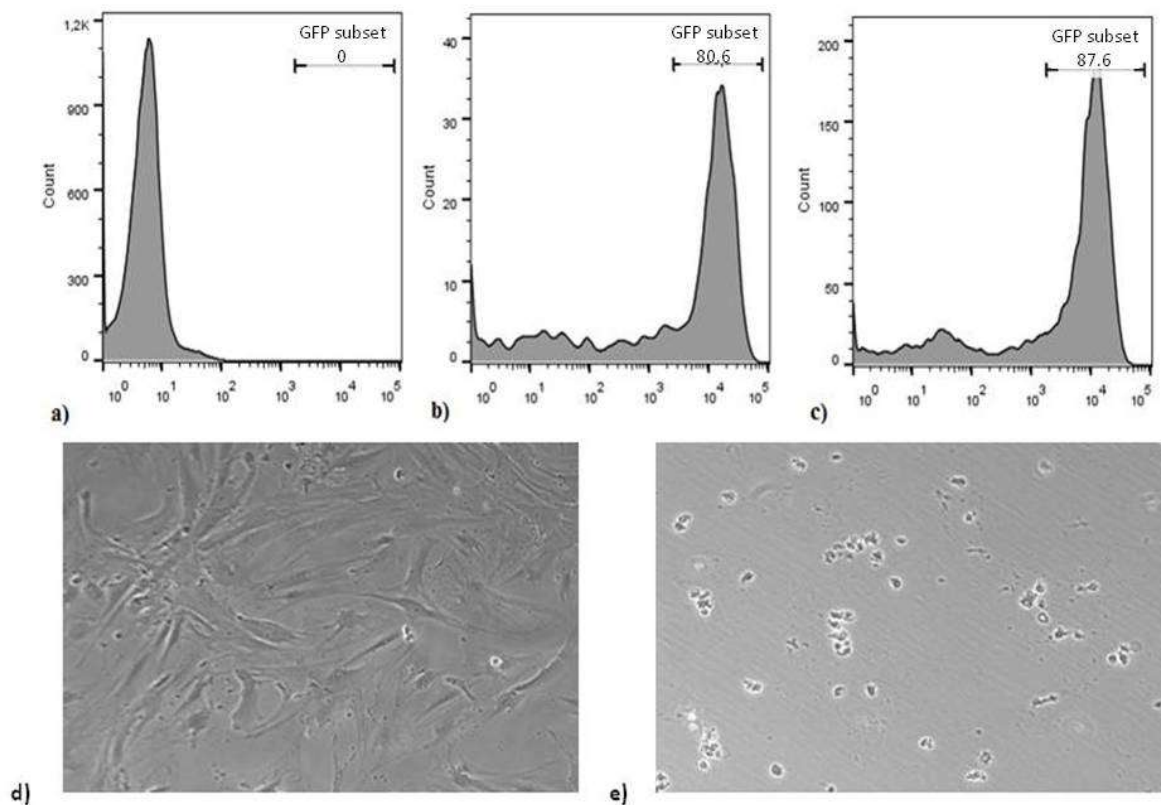


Figure 45: Tri cellulaire par FACS des MSCs non transduites (a), de deux des 5 flasks de MSCs transduites par pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE (b et c). Pour chaque population cellulaire, le pourcentage d'expression de la GFP est mesuré (GFP subset). Les MSCs transduites par pLVX-TetOne-Puro sont visualisées au microscope après traitement à la puromycine (d). Des cellules non transduites sont traitées de la même façon puis visualisées (e).

3) Test d'intégrité de NIS :

Une RT-qPCR a été réalisée afin de mettre en évidence l'expression du gène NIS au sein des MSCs transduites. La quantité d'ADNc de NIS a été normalisée à la quantité d'ADN de $\beta 2$ -microglobuline détectée au sein des cellules. La quantité d'ADNc mesurée au sein des cellules transduites est significativement plus élevée que chez les cellules sauvages (figures 46a et 46c). En effet, celui-ci commence à être détecté au bout 18 cycles de PCR en moyenne chez les MSCs transduites alors qu'on ne le détecte pas au-delà de 30 cycles chez les cellules sauvages. De même, on retrouve davantage d'ADNc au sein des cellules induites par doxycycline que chez les cellules non induites (figures 46b et 46c). Celui-ci n'est détecté qu'au bout de 22 cycles en moyennes chez les MSCs non induites. En normalisant à la quantité de $\beta 2$ microglobuline, ($\Delta_{NIS - \beta 2}$) l'ADNc est détecté au bout de 1,55 cycles chez les cellules induites par la doxycycline contre 5.19 cycles chez celles non traitées par doxycycline.

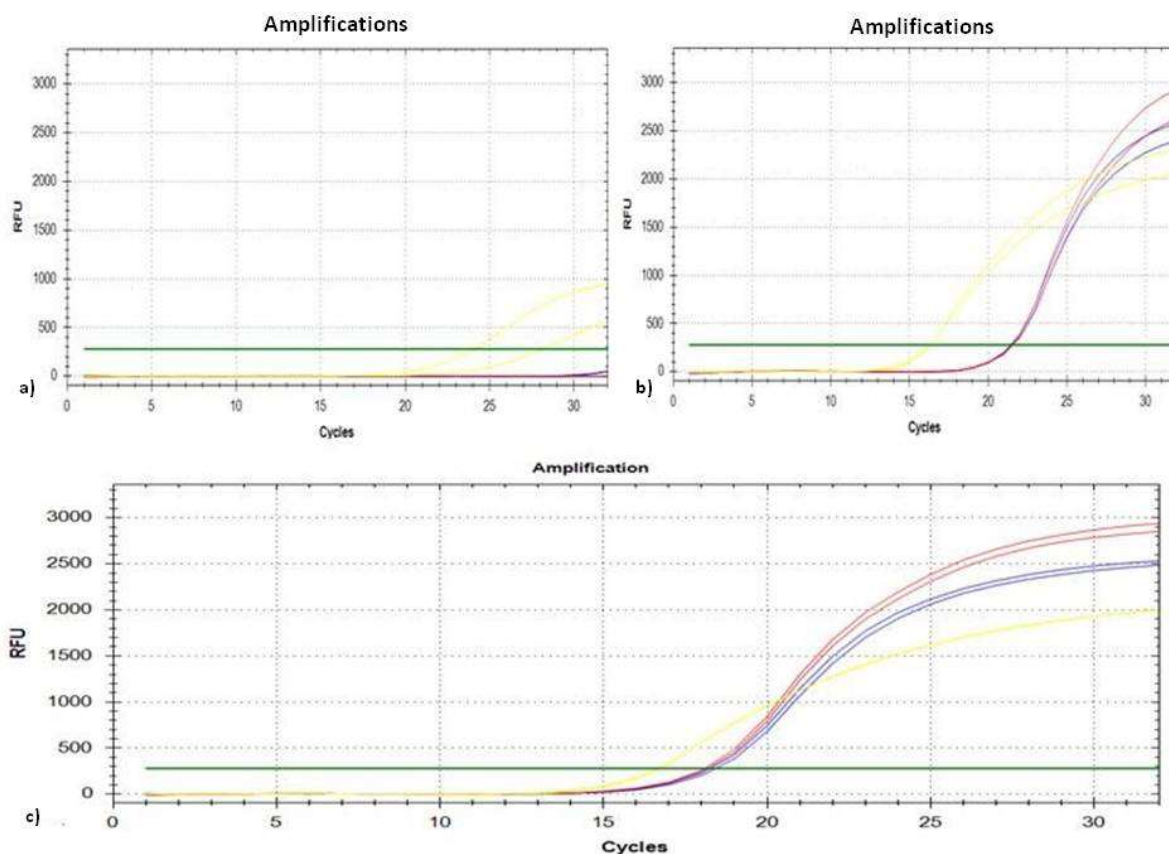


Figure 46: Quantification de l'expression de NIS chez les MSCs WT (a), les MSCs transduites mais non induites par la doxycycline (b) et les MSCs transduites et induites à la doxycycline (c). Le fluorophore utilisé est le SYBR Green (longueur d'onde d'excitation 488 nm ; longueur d'émission 525nm). L'intensité des photons lumineux émis (RFU) est représentée en fonction du nombre de cycles de PCR. Les quantités d'ADNc complémentaire correspondant à l'amplification du couple d'amorce NIS1 (courbe bleue) et du couple NIS2 (courbe rouge) détectées sont normalisées par la $\beta 2$ microglobuline (courbe jaune). Le bruit de fond (courbe verte) est aussi représenté.

4) Test de fonctionnalité de NIS.

La détection de l'ARNm correspondant à NIS n'implique pas la présence de la protéine correspondante ni la fonctionnalité de celle-ci. Ainsi, la captation du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ par les MSCs a été évaluée in-vitro après traitement de celles-ci par la doxycycline pendant 16h.

Une accumulation de radioactivité significativement plus élevée a été mise en évidence chez les cellules exprimant NIS par rapport à celles qui n'expriment pas le transgène. On observe un pic de captation après 30 minutes d'incubation suivi d'une lente décroissance de la radioactivité présente dans les cellules (figure 47). A 30 minutes d'incubation, on observe une accumulation de radioactivité jusqu'à 41 fois plus importante que dans les cellules témoins. De plus, seules les cellules transduites et induites par la doxycycline captent le

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (20 fois plus de radioactivité dans les cellules induites à la doxycycline par rapport à celles non induites à 30 minutes).

De plus, le test d'inhibition au perchlorate met en évidence des captations du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ pour les MSCs transduites semblables aux témoins (figure 47).

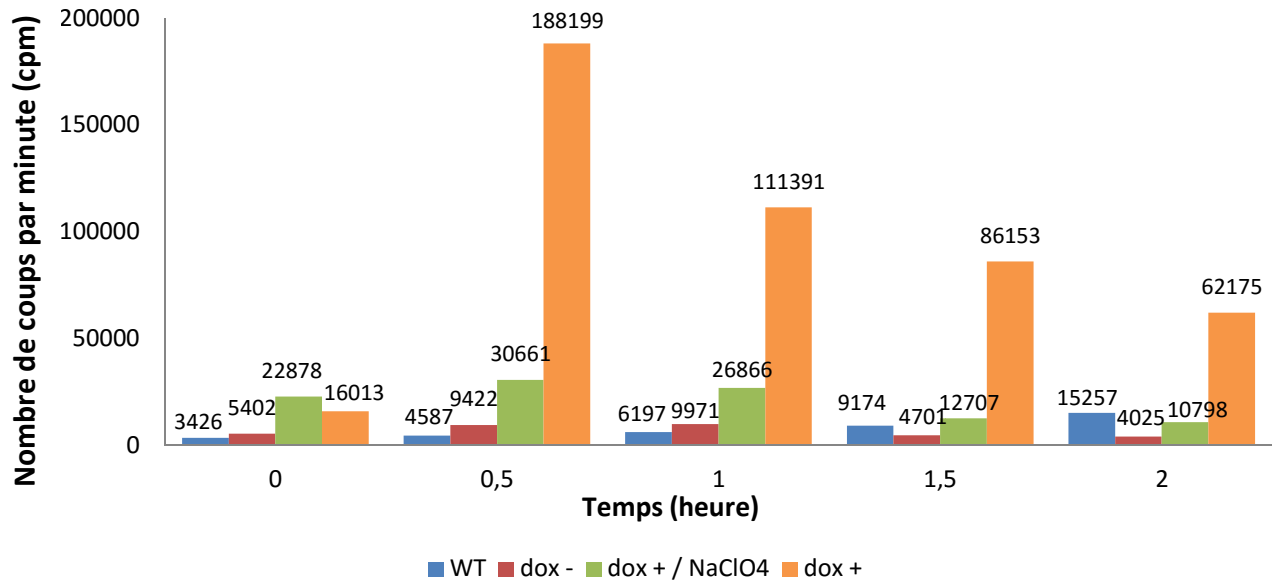


Figure 47: Evolution de la captation in-vitro du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ au cours du temps par les MSCs transduites. Celle-ci a été comparée à celle des cellules sauvages (WT) et à celle de cellules transduites mais non induites par la doxycycline (dox-). La captation du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ par des MSCs transduites et traitées par doxycycline en présence de perchlorate de sodium est significativement plus faible qu'en absence de perchlorate.

5) Imagerie in-vivo.

Les images TEMP sont réalisées 24 heures après administration des MSCs par injection du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ en IV. Les souris sont passées en caméra 30 minutes après injection.

Les images scintigraphiques planaires montrent une accumulation physiologique du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ au niveau de la thyroïde, des glandes salivaires ainsi qu'au niveau de l'estomac chez les souris témoins ainsi que chez les souris injectées (figures 48a 48b, 48c et 48e). De plus, un signal est détecté par gamma-caméra chez toutes les souris injectées (PBS + MSCs) (figures 48a 48b, 48c et 48e). Celui-ci est plus important lorsque 1.10^6 cellules sont injectées (figure 48e). Après couplage des images fonctionnelles TEMP à celles du scanner (CT), on constate que la radioactivité se localise au niveau de l'os tibial (figures 48d et 48f). De plus, l'imagerie TEMP met en évidence un nombre de coups moyen plus élevé au niveau du site d'injection chez toutes les souris par rapport aux pattes opposées (tableau 8). On constate aussi que l'accumulation de radioactivité est plus marquée avec 1.10^6 cellules injectées (2.18 fois plus de coups mesurés au niveau de la patte injectée par rapport à la patte opposée).

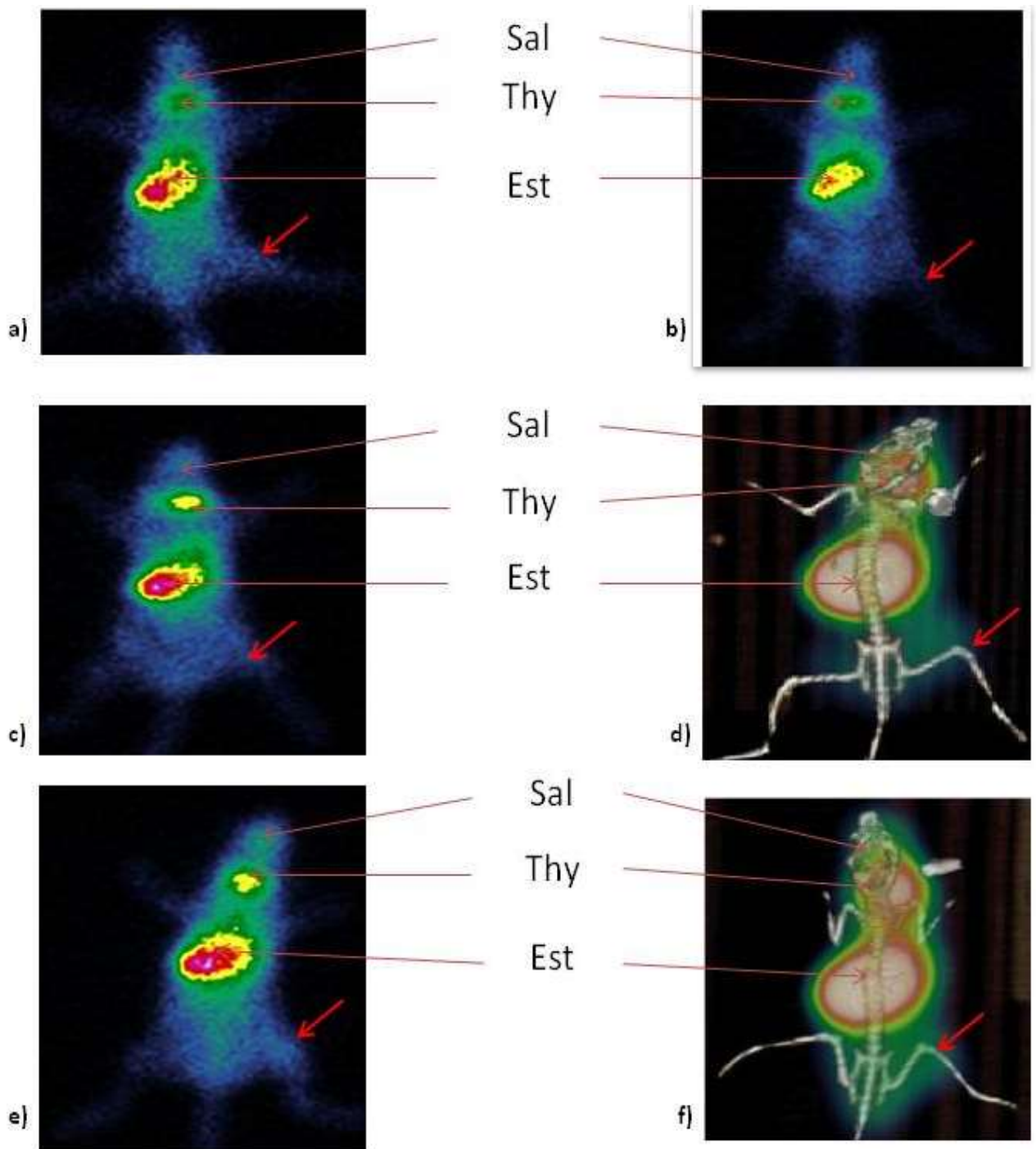


Figure 48: Images TEMP planaires des souris (a, b, c et e) et images TEMP couplée au scanner (d et f). Image des souris 30 minutes après injection de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et 24h après injection de 10 μL de PBS en intra-tibial (flèche rouge) (a), d'une souris avec 5.105 MSCs transduites et non induites à la doxycycline en intra-tibial (flèche rouge) (b). Images TEMP des souris 24h après injection intra-tibiale (flèches rouges) de 5.105 (c) et 1.106 (e) de MSCs transduites et induites par la doxycycline. Images TEMP/CT des souris après injection intra-tibiale (flèches rouges) de 5.105 (d) et 1.106 (f) de MSCs transduites et induites par la doxycycline. On note une forte accumulation de radioactivité au niveau de l'estomac (Est), des glandes salivaires (Sal), de la thyroïde (Th) et de la patte injectée chez toutes les souris (a à f).. Le couplage des imageries planaires avec le scanner (TEMP/CT) montre que la radioactivité se localise au niveau osseux (d et f). L'échelle de couleur utilisée est l'échelle french où le bleu désigne de faibles accumulations de radioactivité et le rouge désigne de fortes accumulations.

Souris	Souris témoin PBS (n = 1)	Souris témoin 0.5 million de MSCs dox – (n = 1)	0.5 million de MSCs dox + injectées. (n = 3)	1 million de MSCs dox + injectées. (n = 3)
Coups moyen par pixel patte témoin (écart-type).	5.640 (s = 3.3)	6.142 (s = 4.029)	8.329 (s = 6.652)	10.211 (s = 5.22)
Coups moyen par pixel patte injectée (écart-type).	6.768 (s = 4)	8.000 (s = 4.087)	14.576 (s = 7.037)	25.260 (s = 10.604)
Rapport patte injectée/patte témoin	1.20	1.30	1.75	2.18
Nombre de pixels	82	81	82	90

Tableau 8: Comparaison du nombre moyen de coups mesurés au niveau de la patte injectée par rapport à la patte opposée pour chaque souris. Les valeurs sont exprimées en coup/pixel. Le nombre total de pixels par patte est indiqué dans le tableau.

Par ailleurs, on mesure une activité plus importante au niveau des pattes injectées chez les souris ayant reçu des MSCs dox + ($5 \cdot 10^5$ et $1 \cdot 10^6$ cellules) par rapport aux souris témoins (figure 49). Cette observation se vérifie aussi pour les pattes opposées chez lesquelles on retrouve des valeurs significativement plus importantes que chez les souris témoins.



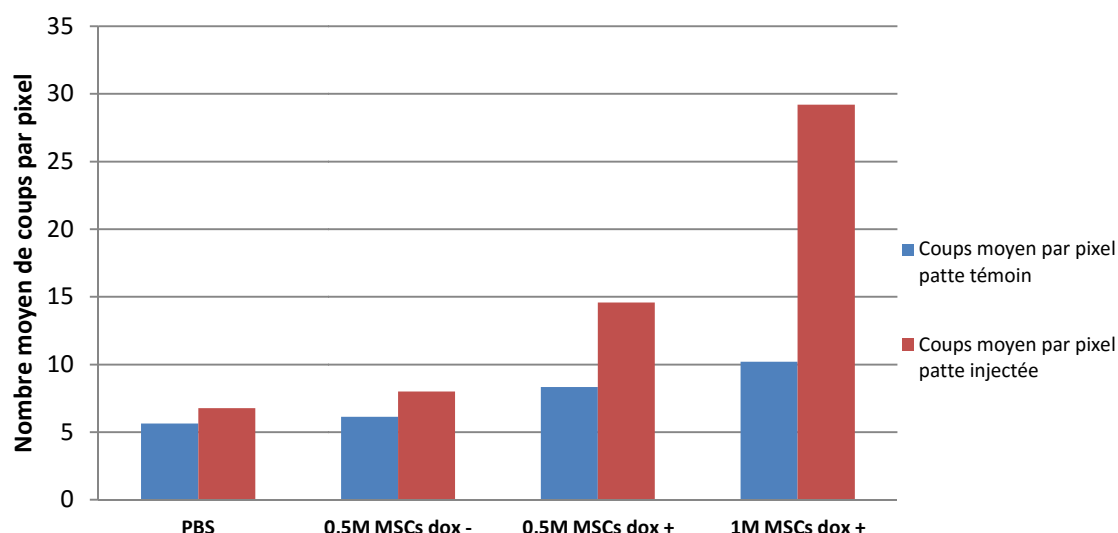


Figure 49 : Variabilités interindividuelles des nombres moyens de coups par pixels au niveau des pattes injectées et opposées entre les souris injectées avec des cellules induites et les souris témoins.

Après sacrifice, récupération et comptage des tibias, on met en évidence une présence de radioactivité plus importante au niveau de l'os des pattes injectées avec 1.10^6 cellules par rapport aux pattes opposées montrant que la distribution du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ est majoritairement osseuse. Chez les autres souris, les tibias des pattes injectées ne contiennent pas plus de radioactivité que ceux des pattes témoins (tableau 9).

Souris	Souris témoin PBS	Souris témoin dox -	0.5M de cellules injectées 24h avant	1M de cellules injectées 24h avant
CPM/g patte opposée	1285745	1284782	1771479	1934500
CPM/g patte injectée	1414320	1387565	2497785	3752930
Rapport patte inj / patte non inj	1.10	1.08	1.41	1.94

Tableau 9: Comptage du nombre de coups par minute (CPM) détectés dans les pattes injectées et non injectées par compteur gamma. Les CPM sont corrigés en retranchant le bruit de fond (mouvement propre) et sont ramenés au poids des pattes (CPM/g). Les rapports des CPM entre patte injectée et non injectée sont calculés pour chaque souris.

DISCUSSION

Le MM est une maladie dont la physiopathologie est très liée à son microenvironnement. L'étude et la visualisation de celui-ci chez des modèles murins est un enjeu capital dans la compréhension de son rôle et l'identification de cibles thérapeutiques potentielles. Actuellement, en dehors du modèle SCID-hu dont l'utilisation reste confidentielle pour des raisons éthiques, aucun des modèles murins de myélome existants ne reproduit la maladie telle qu'elle est observée chez l'homme ; soit il s'agit de modèle transgénique purement murin, soit il s'agit de modèle humanisé mais uniquement sur le versant tumoral, et non sur le versant microenvironnement. Ainsi la plupart de ces modèles sont extra médullaires. C'est la raison pour laquelle l'un des projets de l'équipe 13 du CRCT est de mettre au point un modèle murin humanisé de myélome avec microenvironnement tumoral humanisé, grâce à l'injection intratibiale de MSCs obtenues chez les patients. Si les plasmocytes tumoraux peuvent être facilement visualisés *in-vivo* par imagerie optique, aucune méthode ne permet de visualiser les MSCs en raison de l'atténuation des photons lumineux. Des techniques d'imagerie nucléaire ont l'avantage de s'affranchir de ce phénomène et permettent la quantification des cellules détectées. Les MSCs exprimant un gène rapporteur traçable par imagerie TEMP peuvent ainsi être suivies de façon longitudinale *in-vivo* sur nos modèles murins.

Le gène NIS bénéficie déjà de nombreuses applications dans ce domaine. Les cellules doivent donc exprimer ce transgène codant pour une protéine fonctionnelle qui permet la captation de l'isotope radioactif injecté.

Les vecteurs lentiviraux de troisième génération sont de bons candidats car le gène d'intérêt est directement introduit dans le génome de la cellule hôte. De plus, même les cellules quiescentes peuvent être ciblées. Le choix s'est porté sur le lentivirus plutôt que l'adénovirus car il a été montré que l'on obtenait des taux de transfection plus élevés pour les MSCs (proches de 90%) et une meilleure viabilité avec les vecteurs de cette famille (117). De plus, les lentivirus étant intégratifs, ils permettent une expression du transgène plus durable dans le temps (118). Des études ont de plus montré d'excellents rendements de transduction de gènes thérapeutiques au sein de cellules tumorales pancréatiques grâce aux vecteurs lentiviraux (119). De plus, le développement de vecteurs viraux représente un grand potentiel thérapeutique dans le cadre des médicaments de thérapies innovantes. En effet, de nombreuses études cliniques ont utilisé les vecteurs lentiviraux afin d'induire l'expression de gènes déficitaires dans la cellule hôte. Ces derniers ont montré de bons résultats dans le traitement du Syndrome de Wiskott-Aldrich notamment (120). Par ailleurs, ils représentent



un fort potentiel dans le domaine de la cancérologie où ces derniers peuvent être utilisés comme virus oncolytiques (121). L'évaluation de l'efficacité de l'infection, de la réplication virale au sein des cellules tumorales et donc de l'efficacité du traitement nécessite des techniques d'imagerie non invasives. Les gènes rapporteurs tels que NIS ont un rôle important à jouer dans ce genre d'application (122). Par ailleurs, le gène NIS a l'avantage de pouvoir être utilisé comme gène rapporteur de par sa capacité à permettre l'accumulation de radiotraceurs diagnostiques tels que le $^{99m}\text{TcO}_4^-$ mais aussi comme gène thérapeutique en induisant la captation d'isotopes tels que l'iode 131 au sein des cellules tumorales. Par ailleurs, des études précliniques étudiant la faisabilité d'utiliser la thérapie génique dans le cadre du MM sont en cours.

Le gène NIS a été transduit aux MSCs par utilisation de vecteurs lentiviraux obtenus par tritransfection de plasmides dans des cellules d'empaquetage HEK273T. L'utilisation du gène rapporteur de la GFP a permis d'évaluer la possibilité de modifier les MSCs de façon stable et reproductible. En effet, ces cellules sont difficiles à transduire en raison de leur faible taux de division et par leur fragilité. L'expression stable de la GFP visualisée par microscopie a permis de confirmer la faisabilité de cette méthode. De plus, les plasmides utilisés ont permis d'obtenir de bons rendements de transfection grâce notamment à l'utilisation systématique du polybrène. Ce polymère cationique permet d'annuler les charges négatives présentes au niveau de la membrane cellulaire des BM-MSC ainsi que sur les enveloppes virales et donc de neutraliser les forces de répulsions électrostatiques. En effet, son utilisation permet d'obtenir des taux d'adsorption des particules virales 10 fois plus élevés (124). Celui-ci doit tout de même être utilisé avec prudence car une exposition prolongée des MSCs à cet agent (au-delà de 6 h) inhibe leur capacité de prolifération (125). La RTq-PCR montre que les MSCs expriment de façon stable le gène NIS. De plus, l'expression de celui-ci permet une captation du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ par les cellules transduites significativement plus importante que celles qui n'expriment pas NIS. La cinétique de captation met en évidence un pic de radioactivité au bout d'une demi-heure d'incubation. Ce pic est suivi d'une décroissance de la radioactivité détectée dans les cellules. Celle-ci s'explique par un phénomène d'efflux du $^{99m}\text{TcO}_4^-$. De plus, le test d'inhibition au perchlorate de sodium, inhibiteur sélectif de NIS, montre que lui seul est impliqué dans la captation du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ par les MSCs.

Les imageries TEMP *in-vivo* chez les modèles murins ont été faites 30 minutes après injection du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ de façon à se situer au pic de captation par les cellules. Un signal est détecté au niveau du site d'injection chez toutes les souris injectées (PBS + MSCs). De plus, l'imagerie mesure un nombre moyen de coups par pixel plus élevé dans la patte injectée par

rapport à la patte opposée chez toutes les souris. Cette différence est plus marquée avec 1.10^6 MSCs injectées (2.18 fois plus de coups que dans la patte opposée). On observe aussi une forte accumulation de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ au niveau de l'estomac, des glandes salivaires et de la thyroïde chez toutes les souris (témoins et souris tests). Celle-ci est liée à l'expression physiologique de NIS au niveau de ces tissus. En couplant les images TEMP au scanner, on constate que la radioactivité se localise au niveau de l'os.

Afin de s'assurer que la distribution est essentiellement osseuse, les souris ont été disséquées et les tibias ont été comptés. Chez les souris témoins (PBS et dox -) ainsi que chez celles ayant reçu 5.10^5 de cellules dox +, le nombre de coups mesurés dans le tibia des pattes injectées ne diffère pas de celui mesuré dans le tibia des pattes opposées. Ceci montre que la présence de radioactivité est secondaire à une inflammation engendrée par le traumatisme provoqué par l'injection intra-tibiale des cellules. Ainsi, la distribution du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ est principalement tissulaire car due à un afflux sanguin et non osseuse. L'injection de 5.10^5 MSCs ne suffit pas à leur localisation par TEMP. En revanche, sur les souris ayant reçu 1.10^6 de cellules, on détecte une radioactivité 1.94 fois plus importante dans le tibia de la patte injectée par rapport à celui de la patte opposée. Ces résultats nous orientent vers une fixation spécifique des MSCs injectées. Chez ces souris, les différences détectées entre les pattes injectées et témoins restent néanmoins faibles. Ceci peut s'expliquer par une localisation tissulaire d'une partie du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et par le bruit de fond important engendré par cette méthode d'imagerie. Un nombre plus important de MSCs doit être utilisé afin de contrecarrer ces deux phénomènes et ainsi augmenter les rapports de détection entre patte injectée et patte témoin. Ceci s'accompagnera d'un volume d'injection plus important qui pourrait s'avérer problématique pour la voie intra-tibiale. Des équipes travaillant sur des modèles NSG injectent les MSCs en intra-fémoral. Ce site a l'avantage de permettre l'injection de plus gros volumes qu'en intra-tibial ($20\mu\text{L}$ au lieu de $10\mu\text{L}$) (126) et donc l'injection d'un nombre plus important de MSCs. Ces expérimentations devront être réalisées sur des cohortes plus étendues afin de confirmer la tendance observée.

La mesure de l'activité au niveau des pattes par l'imagerie TEMP montre que le nombre de coups par pixel est nettement plus élevé chez les souris ayant reçu des MSCs dox+ (5.10^5 et 1.10^6). Cette observation se fait aussi bien dans les pattes injectées que dans les pattes opposées. Ceci pourrait s'expliquer par la migration des MSCs vers une autre niche. Un nombre plus important de cellules lors de l'injection permettra de vérifier cette hypothèse.

L'ensemble de ces travaux démontre que l'imagerie couplée métabolique et anatomique TEMP/CT peut représenter une alternative à la bioluminescence pour visualiser le microenvironnement *in-vivo* sur ces modèles murins. Les expériences ont été réalisées sur



des modèles sains. Une injection concomitante de plasmocytes tumoraux et de MSCs permettra de le visualiser en situation pathologique. De plus, il sera possible de réaliser des imageries longitudinales, c'est-à-dire de visualiser le microenvironnement au fur et à mesure de la progression de la maladie chez une même souris.

Des méthodes d'imageries multimodales permettront aussi de visualiser de façon rapprochée les plasmocytes tumoraux et les MSCs injectés. En effet, les plasmocytes pourront être observés par bioluminescence ou d'autres techniques d'imagerie nucléaire comme la TEP (Tomographie par Emission de Positons). Cette dernière nécessitera de modifier génétiquement les plasmocytes pour qu'ils captent l'isotope radioactif injecté à la souris (fluor 18, émetteur β^+). Le gène Herpès Simplex Virus-1 thymidine kinase (HSV-tk) code pour une thymidine kinase qui transforme certains composés comme le [^{18}F] 9-[4-fluoro-3-hydroxymethylbutyl]guanine ([^{18}F]FHBG) en une forme phosphorylée ne pouvant plus franchir la membrane cellulaire. Celle-ci se retrouve donc piégée au sein des cellules exprimant la kinase. Le [^{18}F]FHBG fait l'objet d'évaluation clinique notamment pour le suivi *in-vivo* de cellules comme les lymphocytes T préalablement transfectés par HSV-tk (127). Il permet la visualisation *in-vivo* des lymphocytes chez le modèle murin ainsi que chez des patients. Une autre approche pour la visualisation *in-vivo* des plasmocytes tumoraux chez les souris NSG est en cours d'étude. Elle consiste à marquer des anticorps anti-CD138 à l'iode 123 afin de pouvoir les tracer par TEMP.

Enfin, les méthodes d'imagerie TEMP et TEP présentent l'avantage de pouvoir être facilement transposables en clinique contrairement aux méthodes d'imagerie optique qui ne sont pas encore approuvées pour l'usage chez l'homme.



CONCLUSION

Ce travail montre que l'utilisation de l'imagerie fusionnée anatomique et métabolique TEMP/CT, dont l'utilisation est approuvée chez l'homme, représente une alternative intéressante à la bioluminescence pour la visualisation *in-vivo* du microenvironnement tumoral du MM chez le modèle murin. L'utilisation de cette technique passe par la modification génique de MSCs directement prélevées chez les patients en intégrant le gène NIS au sein de leur génome grâce à des vecteurs viraux. Ainsi, l'accumulation du $^{99m}\text{TcO}_4^-$ injecté est spécifique aux MSCs injectées exprimant le transgène et est visible *in-vivo*. Ce travail a permis le développement d'un outil précieux de visualisation et de suivi des MSCs humaines injectées chez les souris NSG en intratibial, et ainsi contribué à l'avancement du projet de l'équipe 13 du CRCT de mise au point du modèle murin à microenvironnement humanisé dans le MM en vue de l'étude de ce dernier au cours des différents stades de la maladie.



REFERENCES

1. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. 4e édition. Elsevier; 2013. 283 p.
2. Lydyard P, Whelam A, Fanger M-W. L'essentiel en immunologie. BERTI Editions. 2002.
3. Lymphocytes B : diversité, ontogénèse, différenciation et activation - page82-7.-lymphocytes-b.pdf [Internet]. [cité 19 mai 2016]. Disponible sur: http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02_files/page82-7.-lymphocytes-b.pdf
4. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 1 sept 2008;112(5):1570-80.
5. http://dcm1amiens.free.fr/Cours/1er%20semestre/Immunologie/chp3_Lymphocyte%20B%20-%20marqueurs,%20et%20differentiation%20et%20activation.doc.
6. Gerd-Rüdiger Burmester, Antonio Pezzuto. Atlas de poche d'immunologie. 2e édition. Paris: Flammarion; 2003. 321 p. (Médecine-Sciences).
7. Actor JK. Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology: with STUDENT CONSULT Online Access. Elsevier Health Sciences; 2011. 208 p.
8. Feuillard J, Raphaël M. Différenciation lymphocytaire B et lymphomes B périphériques. *Hématologie*. 21 déc 2000;6(5):345-59.
9. MyelomeMultiple.pdf [Internet]. [cité 21 mars 2016]. Disponible sur: <http://www.hematologie.net/hematolo/UserFiles/File/MyelomeMultiple.pdf>
10. Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK. Myeloma VL and VH gene sequences reveal a complementary imprint of antigen selection in tumor cells. *Blood*. 1 janv 1997;89(1):219-26.
11. Vescio RA, Cao J, Hong CH, Lee JC, Wu CH, Der Danielian M, et al. Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intracлонаl diversity. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 sept 1995;155(5):2487-97.
12. Billadeau D, Ahmann G, Greipp P, Ness BV. The bone marrow of multiple myeloma patients contains B cell populations at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell. *J Exp Med*. 9 janv 1993;178(3):1023-31.



13. Jego G, Robillard N, Puthier D, Amiot M, Accard F, Pineau D, et al. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood*. 15 juill 1999;94(2):701-12.
14. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*. 15 avr 2007;109(8):3489-95.
15. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res*. 15 févr 2004;64(4):1546-58.
16. Barillé-Nion S, Barlogie B, Bataille R, Bergsagel PL, Epstein J, Fenton RG, et al. Advances in biology and therapy of multiple myeloma. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2003;248-78.
17. Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Curr Probl Cancer*. févr 2009;33(1):7-64.
18. Hervé A-L, Florence M, Philippe M, Michel A, Thierry F, Kenneth A, et al. Molecular Heterogeneity of Multiple Myeloma: Pathogenesis, Prognosis, and Therapeutic Implications. *J Clin Oncol*. 5 oct 2011;29(14):1893-7.
19. Drach J, Ackermann J, Fritz E, Krömer E, Schuster R, Gisslinger H, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood*. 1 août 1998;92(3):802-9.
20. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple Myeloma: Increasing Evidence for a Multistep Transformation Process. *Blood*. 1 janv 1998;91(1):3-21.
21. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp M-J, Harousseau J-L, et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood*. 15 mars 2002;99(6):2185-91.
22. Rajkumar SV. MGUS and Smoldering Multiple Myeloma: Update on Pathogenesis, Natural History, and Management. *ASH Educ Program Book*. 1 janv 2005;2005(1):340-5.
23. The 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*. 1 juin 2003;121(5):749-57.
24. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. janv 2003;78(1):21-33.



25. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 mars 1999;96(7):3540-5.
26. Giuliani N, Bataille R, Mancini C, Lazzaretti M, Barillé S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood*. 15 déc 2001;98(13):3527-33.
27. Standal T, Seidel C, Hjertner Ø, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*. 15 oct 2002;100(8):3002-7.
28. Sfiridaki K, Pappa CA, Tsirakis G, Kanellou P, Kaparou M, Stratinaki M, et al. Angiogenesis-Related Cytokines, RANKL, and Osteoprotegerin in Multiple Myeloma Patients in relation to Clinical Features and Response to Treatment, Angiogenesis-Related Cytokines, RANKL, and Osteoprotegerin in Multiple Myeloma Patients in relation to Clinical Features and Response to Treatment. *Mediat Inflamm Mediat Inflamm*. 18 sept 2011;2011, 2011:e867576.
29. Garcia-Gomez A, Sanchez-Guijo F, Del Cañizo MC, San Miguel JF, Garayoa M. Multiple myeloma mesenchymal stromal cells: Contribution to myeloma bone disease and therapeutics. *World J Stem Cells*. 26 juill 2014;6(3):322-43.
30. Macro M, Arnulf B, Leleu X. Le myélome multiple de l'IMW à l'EHA, 2011 : un grand cru. *Hématologie*. 31 déc 2011;17(8):3-41.
31. Sanders PW, Booker BB. Pathobiology of cast nephropathy from human Bence Jones proteins. *J Clin Invest*. févr 1992;89(2):630-9.
32. Atteinte rénale au cours du myélome - cours.pdf [Internet]. [cité 1 déc 2015]. Disponible sur: http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_38/site/html/cours.pdf
33. Kyle R, Rajkumar S. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund UK*. janv 2009;23(1):3-9.
34. Silvestris F, Cafforio P, Tucci M, Dammacco F. Negative regulation of erythroblast maturation by Fas-L(+)/TRAIL(+) highly malignant plasma cells: a major pathogenetic mechanism of anemia in multiple myeloma. *Blood*. 15 févr 2002;99(4):1305-13.



35. San Miguel JF, Gutiérrez NC, Mateo G, Orfao A. Conventional diagnostics in multiple myeloma. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. juill 2006;42(11):1510-9.
36. Kyle RA. Sequence of testing for monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med*. févr 1999;123(2):114-8.
37. Dispenzieri A, Gertz MA, Therneau TM, Kyle RA. Retrospective cohort study of 148 patients with polyclonal gammopathy. *Mayo Clin Proc*. mai 2001;76(5):476-87.
38. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. févr 2009;23(2):215-24.
39. San-Miguel JF, Paiva B, Gutiérrez NC. New tools for diagnosis and monitoring of multiple myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book ASCO Am Soc Clin Oncol Meet*. 2013;
40. An G, Qin X, Acharya C, Xu Y, Deng S, Shi L, et al. Multiple myeloma patients with low proportion of circulating plasma cells had similar survival with primary plasma cell leukemia patients. *Ann Hematol*. févr 2015;94(2):257-64.
41. Billadeau D, Van Ness B, Kimlinger T, Kyle RA, Therneau TM, Greipp PR, et al. Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma, and active myeloma. *Blood*. 1 juill 1996;88(1):289-96.
42. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, Tracz MJ, Gertz MA, Lacy MQ, et al. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 1 oct 2005;106(7):2276-9.
43. Boccadoro M, Pileri A. Plasma cell dyscrasias: classification, clinical and laboratory characteristics, and differential diagnosis. *Baillières Clin Haematol*. déc 1995;8(4):705-19.
44. Greipp PR, Raymond NM, Kyle RA, O'Fallon WM. Multiple myeloma: significance of plasmablastic subtype in morphological classification. *Blood*. 1 févr 1985;65(2):305-10.
45. Goasguen JE, Zandecki M, Mathiot C, Scheiff JM, Bizet M, Ly-Sunnaram B, et al. Mature plasma cells as indicator of better prognosis in multiple myeloma. New methodology for the assessment of plasma cell morphology. *Leuk Res*. déc 1999;23(12):1133-40.
46. Ribourtout B, Zandecki M. Plasma cell morphology in multiple myeloma and related disorders. *Morphol Bull Assoc Anat*. juin 2015;99(325):38-62.
47. Gardais J, Geneviève F, Foussard C, Delisle V, Zandecki M. Is there any significance for intracellular crystals in plasma cells from patients with monoclonal gammopathies? *Eur J Haematol*. août 2001;67(2):119-22.



48. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. nov 2014;15(12):e538-548.
49. Rajkumar SV. Myeloma today: Disease definitions and treatment advances. *Am J Hematol*. 1 janv 2016;91(1):90-100.
50. Chou T. Multiple myeloma : recent progress in diagnosis and treatment. *J Clin Exp Hematop JCEH*. 2012;52(3):149-59.
51. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *Lancet Lond Engl*. 30 mai 2015;385(9983):2197-208.
52. Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1 sept 1975;36(3):842-54.
53. Greipp PR, Miguel JS, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International Staging System for Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 20 mai 2005;23(15):3412-20.
54. Avet-Loiseau H, Attal M, Campion L, Caillot D, Hulin C, Marit G, et al. Long-term analysis of the IFM 99 trials for myeloma: cytogenetic abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 juin 2012;30(16):1949-52.
55. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc*. avr 2013;88(4):360-76.
56. Du J, Huo J, Shi J, Yuan Z, Zhang C, Fu W, et al. Polymorphisms of nuclear factor- κ B family genes are associated with development of multiple myeloma and treatment outcome in patients receiving bortezomib-based regimens. *Haematologica*. mai 2011;96(5):729-37.
57. Bartl R, Frisch B, Burkhardt R, Fateh-Moghadam A, Mahl G, Gierster P, et al. Bone marrow histology in myeloma: its importance in diagnosis, prognosis, classification and staging. *Br J Haematol*. juill 1982;51(3):361-75.
58. Greipp PR, Leong T, Bennett JM, Gaillard JP, Klein B, Stewart JA, et al. Plasmablastic morphology--an independent prognostic factor with clinical and laboratory correlates: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) myeloma trial E9486 report by the ECOG Myeloma Laboratory Group. *Blood*. 1 avr 1998;91(7):2501-7.



59. Binder M, Rajkumar SV, Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Buadi FK, et al. Predictors of early response to initial therapy in patients with newly diagnosed symptomatic multiple myeloma. *Am J Hematol.* oct 2015;90(10):888-91.
60. Mutlu P, Kiraz Y, Gündüz U, Baran Y. An update on molecular biology and drug resistance mechanisms of multiple myeloma. *Crit Rev Oncol Hematol.* déc 2015;96(3):413-24.
61. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. *N Engl J Med.* 11 juill 1996;335(2):91-7.
62. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med.* 18 nov 1999;341(21):1565-71.
63. Mazumder A, Jagannath S. Thalidomide and lenalidomide in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol.* déc 2006;19(4):769-80.
64. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 1 avr 2001;61(7):3071-6.
65. Feinman R, Koury J, Thames M, Barlogie B, Epstein J, Siegel DS. Role of NF-kappaB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bcl-2. *Blood.* 1 mai 1999;93(9):3044-52.
66. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, et al. NF-κB as a Therapeutic Target in Multiple Myeloma. *J Biol Chem.* 5 oct 2002;277(19):16639-47.
67. Pasquier F. Place actuelle des inhibiteurs du protéasome dans le traitement du myélome multiple. *Hématologie.* 2006;12(1):67-76.
68. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 16 juin 2005;352(24):2487-98.
69. Painuly U, Kumar S. Efficacy of Bortezomib as First-Line Treatment for Patients with Multiple Myeloma. *Clin Med Insights Oncol.* 28 févr 2013;7:53-73.
70. Nguyen A. Morphoproteomics study for a newly-diagnosed diffuse large B cell lymphoma case. 2011;8(30).



71. Harousseau J-L, Attal M, Avet-Loiseau H, Marit G, Caillot D, Mohty M, et al. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 oct 2010;28(30):4621-9.
72. Roussel M, Lauwers-Cances V, Robillard N, Hulin C, Leleu X, Benboubker L, et al. Front-line transplantation program with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination as induction and consolidation followed by lenalidomide maintenance in patients with multiple myeloma: a phase II study by the Intergroupe Francophone du Myélome. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 sept 2014;32(25):2712-7.
73. Single versus Double Autologous Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma — NEJM [Internet]. [cité 21 mars 2016]. Disponible sur: <http://www.nejm.org.gate2.inist.fr/doi/full/10.1056/NEJMoa032290>
74. 2.pdf [Internet]. [cité 21 mars 2016]. Disponible sur: <http://www.haemalogix.com/pdf/other/2.pdf>
75. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, Fonseca R, Vesole DH, Williams ME, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. janv 2010;11(1):29-37.
76. San Miguel J, Weisel K, Moreau P, Lacy M, Song K, Delforge M, et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. oct 2013;14(11):1055-66.
77. Press Announcements - FDA approves Darzalex for patients with previously treated multiple myeloma [Internet]. [cité 27 janv 2016]. Disponible sur: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm472875.htm>
78. Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, Nahi H, Gimsing P, Hansson M, et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 24 sept 2015;373(13):1207-19.
79. Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, Singhal S, Chari A, Bahlis NJ, et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Lond Engl*. 6 janv 2016;



80. van de Donk NWCJ, Moreau P, Plesner T, Palumbo A, Gay F, Laubach JP, et al. Clinical efficacy and management of monoclonal antibodies targeting CD38 and SLAMF7 in multiple myeloma. *Blood*. 2 déc 2015;
81. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study - *The Lancet Oncology* [Internet]. [cité 21 mars 2016]. Disponible sur: [http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045\(15\)00464-7.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045(15)00464-7.pdf)
82. Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. déc 2002;2(12):927-37.
83. Ribatti D, Moschetta M, Vacca A. Microenvironment and multiple myeloma spread. *Thromb Res*. mai 2014;133, Supplement 2:S102-6.
84. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the « seed and soil » hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. juin 2003;3(6):453-8.
85. Manier S, Sacco A, Leleu X, Ghobrial IM, Roccaro AM, Manier S, et al. Bone Marrow Microenvironment in Multiple Myeloma Progression, Bone Marrow Microenvironment in Multiple Myeloma Progression. *BioMed Res Int BioMed Res Int*. 3 oct 2012;2012, 2012:e157496.
86. Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, Mirshahi P, et al. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer*. 1 mai 2010;126(9):2090-101.
87. Kudo-Saito C. Cancer-associated mesenchymal stem cells aggravate tumor progression. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 1 avr 2015 [cité 18 mai 2016];3. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4381695/>
88. Corre J, Mahtouk K, Attal M, Gadelorge M, Huynh A, Fleury-Cappellesso S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund UK*. mai 2007;21(5):1079-88.
89. Reagan MR, Ghobrial IM. Multiple Myeloma Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Origin, and Tumor-Promoting Effects. *Clin Cancer Res*. 15 janv 2012;18(2):342-9.
90. Zdzisińska B, Bojarska-Junak A, Dmoszyńska A, Kandefer-Szerszeń M. Abnormal cytokine production by bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 30 mai 2008;56(3):207-21.
91. Bernard Klein, Régis Bataille. Interleukine 6 et myélome multiple chez l'homme. 1991;

92. Burger R. Impact of Interleukin-6 in Hematological Malignancies. *Transfus Med Hemotherapy*. 19 juill 2013;40(5):336-43.
93. Corre J, Labat E, Espagnol N, Hébraud B, Avet-Loiseau H, Roussel M, et al. Bioactivity and Prognostic Significance of Growth Differentiation Factor GDF15 Secreted by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma. *Cancer Res*. 15 mars 2012;72(6):1395-406.
94. Karadag, Oyajobi, Apperley, Russell, Croucher. Human myeloma cells promote the production of interleukin 6 by primary human osteoblasts. *Br J Haematol*. 1 févr 2000;108(2):383-90.
95. Balakumaran A, Robey PG, Fedarko N, Landgren O. Bone marrow microenvironment in myelomagenesis: its potential role in early diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*. mai 2010;10(4):465-80.
96. Markovina S, Callander NS, O'Connor SL, Kim J, Werndli JE, Raschko M, et al. Bortezomib-Resistant Nuclear Factor- κ B Activity in Multiple Myeloma Cells. *Mol Cancer Res*. 8 janv 2008;6(8):1356-64.
97. Markovina S, Callander NS, O'Connor SL, Xu G, Shi Y, Leith CP, et al. Bone marrow stromal cells from multiple myeloma patients uniquely induce bortezomib resistant NF- κ B activity in myeloma cells. *Mol Cancer*. 6 juill 2010;9(1):1.
98. Huang Y-W, Richardson JA, Tong AW, Zhang B-Q, Stone MJ, Vitetta ES. Disseminated Growth of a Human Multiple Myeloma Cell Line in Mice with Severe Combined Immunodeficiency Disease. *Cancer Res*. 15 mars 1993;53(6):1392-6.
99. Paton-Hough J, Chantry AD, Lawson MA. A review of current murine models of multiple myeloma used to assess the efficacy of therapeutic agents on tumour growth and bone disease. *Bone*. août 2015;77:57-68.
100. Tassone P, Neri P, Carrasco DR, Burger R, Goldmacher VS, Fram R, et al. A clinically relevant SCID-hu in vivo model of human multiple myeloma. *Blood*. 15 juill 2005;106(2):713-6.
101. Schueler J, Wider D, Klingner K, Siegers GM, May AM, Wäsch R, et al. Intratibial Injection of Human Multiple Myeloma Cells in NOD/SCID IL-2R γ (Null) Mice Mimics Human Myeloma and Serves as a Valuable Tool for the Development of Anticancer Strategies. *PLOS ONE*. 6 nov 2013;8(11):e79939.
102. Riedel SS, Mottok A, Brede C, Bäuerlein CA, Jordán Garrote A-L, Ritz M, et al. Non-Invasive Imaging Provides Spatiotemporal Information on Disease Progression and



Response to Therapy in a Murine Model of Multiple Myeloma. PLoS ONE [Internet]. 26 déc 2012 [cité 14 avr 2016];7(12). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3530556/>

103. Kang JH, Chung J-K. Molecular-genetic imaging based on reporter gene expression. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. juin 2008;49 Suppl 2:164S-79S.

104. Fruhwirth GO, Diocou S, Blower PJ, Ng T, Mullen GED. A whole-body dual-modality radionuclide optical strategy for preclinical imaging of metastasis and heterogeneous treatment response in different microenvironments. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. avr 2014;55(4):686-94.

105. Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res [Internet]*. 6 juill 2012 [cité 14 avr 2016];1. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3507026/>

106. Alsaggar M, Liu D. Chapter One - Physical Methods for Gene Transfer. In: Leaf Huang DL and EW, éditeur. *Advances in Genetics [Internet]*. Academic Press; 2015 [cité 18 mai 2016]. p. 1-24. (Nonviral Vectors for Gene Therapy Physical Methods and Medical Translation; vol. 89). Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065266014000029>

107. Fuller DH, Loudon P, Schmaljohn C. Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods*. sept 2006;40(1):86-97.

108. Legendre J-Y, Haensler J, Remy J-S. Les vecteurs non viraux de thérapie génique. *MS Médecine Sci*. 1996;12(12):1334-41.

109. Schnyder A, Huwyler J. Drug Transport to Brain with Targeted Liposomes. *NeuroRx*. janv 2005;2(1):99-107.

110. Wickham TJ. Ligand-directed targeting of genes to the site of disease. *Nat Med*. janv 2003;9(1):135-9.

111. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay J-P, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med*. 18 avr 2002;346(16):1185-93.

112. Hacein-Bey-Abina S, Kalle CV, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science*. 17 oct 2003;302(5644):415-9.



113. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao G, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab.* sept 2003;80(1–2):148-58.
114. Karlsson Hedestam GB, Fouchier RAM, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol.* févr 2008;6(2):143-55.
115. Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS. High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol.* avr 1996;70(4):2581-5.
116. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J.* 1 mai 2012;443(3):603-18.
117. McMahon JM, Conroy S, Lyons M, Greiser U, O'shea C, Strappe P, et al. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. *Stem Cells Dev.* févr 2006;15(1):87-96.
118. Kim HJ, Jeon YH, Kang JH, Lee YJ, Kim KI, Chung HK, et al. In vivo long-term imaging and radioiodine therapy by sodium-iodide symporter gene expression using a lentiviral system containing ubiquitin C promoter. *Cancer Biol Ther.* juill 2007;6(7):1130-5.
119. Ravet E, Lulka H, Gross F, Casteilla L, Buscail L, Cordelier P. Using lentiviral vectors for efficient pancreatic cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* mai 2010;17(5):315-24.
120. Hacein-Bey Abina S, Gaspar H, Blondeau J, et al. Outcomes following gene therapy in patients with severe wiskott-aldrich syndrome. *JAMA.* 21 avr 2015;313(15):1550-63.
121. Ungerechts G, Bossow S, Leuchs B, Holm PS, Rommelaere J, Coffey M, et al. Moving oncolytic viruses into the clinic: clinical-grade production, purification, and characterization of diverse oncolytic viruses. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;3:16018.
122. Miller A, Russell SJ. The use of the NIS reporter gene for optimizing oncolytic virotherapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2016;16(1):15-32.
123. Jiang H, Zhang W, Shang P, Zhang H, Fu W, Ye F, et al. Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells. *Mol Oncol.* mars 2014;8(2):297-310.
124. Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem.* 19 juin 2002;97(2-3):159-72.



125. Lin P, Correa D, Lin Y, Caplan AI. Polybrene inhibits human mesenchymal stem cell proliferation during lentiviral transduction. *PloS One*. 2011;6(8):e23891.
126. Werner-Klein M, Proske J, Werno C, Schneider K, Hofmann H-S, Rack B, et al. Immune Humanization of Immunodeficient Mice Using Diagnostic Bone Marrow Aspirates from Carcinoma Patients. *PLOS ONE*. 15 mai 2014;9(5):e97860.
127. Eissenberg LG, Rettig MP, Ritchey JK, Prior JL, Schwarz SW, Frye J, et al. [(18)F]FHBG PET/CT Imaging of CD34-TK75 Transduced Donor T Cells in Relapsed Allogeneic Stem Cell Transplant Patients: Safety and Feasibility. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. juin 2015;23(6):1110-22.



SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



Imagerie *in-vivo* du microenvironnement tumoral du myélome multiple par TEMP/CT

Le myélome multiple est une hémopathie dépendante du microenvironnement médullaire tumoral. Celui-ci est constitué de diverses populations cellulaires parmi lesquelles figurent les cellules souches mésenchymateuses médullaires (MSCs). Ces dernières diffèrent de celles dérivées des sujets sains et jouent un grand rôle dans la physiopathologie de par leur action protumorale. En effet, elles sécrètent diverses cytokines et établissent de nombreuses interactions avec les cellules tumorales permettant l'activation de voies de signalisation cellulaires impliquées dans la prolifération, la survie, la chimiorésistance et la dissémination des cellules tumorales. Leur visualisation *in-vivo* est donc un enjeu important pour la compréhension des cinétiques des interactions entre le microenvironnement et les plasmocytes ainsi que pour l'évaluation de nouveaux traitements. Nous avons utilisé l'imagerie métabolique nucléaire TEMP, méthode sensible et sans limite de profondeur. Pour cela, nous avons modifié génétiquement des MSCs de patients avec l'ADNc codant le gène Sodium Iodide Symporter à l'aide de lentivirus. L'expression de ce gène leur permet de capter l'isotope radioactif de référence en TEMP : le ^{99m}Tc . La transduction a été validée par des tests *in-vitro*. Les cellules ainsi modifiées ont été injectées à des souris NOD-scid-IL2 γ (null) (NSG) en intra-tibial puis visualisées par SPECT après administration de ^{99m}Tc .

Mots-clés : Myélome multiple, microenvironnement tumoral, imagerie *in-vivo*, TEMP/CT

***In-vivo* imaging of multiple myeloma microenvironment by SPECT/CT**

Multiple Myeloma is a highly bone marrow (BM) microenvironment dependent blood disease. BM microenvironment is composed of several cell lines like mesenchymal stem cells (MSCs). They differ from cells issue from healthy patients by their protumoral activity. Indeed, they secrete various factors that promote proliferation, survival, chemoresistance and progression of MM cells. These cells are involved in MM physiopathology and *in-vivo* visualization is important for the assessment of new treatments. We used nuclear SPECT imaging which is a molecular imaging with high sensitivity and no depth limit. Patient derived MSCs are modified with the sodium iodide symporter gene (NIS) by using lentivectors. Transgene expression by MSCs led to standard radioactive isotope uptake for SPECT imaging: ^{99m}Tc . Transduction efficiency was tested *in-vitro*. Then, modified cells were injected to NOD-scid-IL2 γ (null) (NSG) mice by intra-tibial approach and detected by SPECT after ^{99m}Tc injection.

Keywords : Multiple myeloma, microenvironment, *in-vivo* imaging, SPECT/CT

