

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

# **RECHERCHE DE MARQUEURS MOLECULAIRES PREDICTIFS DANS LE MYELOME MULTIPLE.**

## **THESE DE DOCTORAT**

École doctorale BIOLOGIE SANTE

Discipline : Génomique

Spécialité : Hématologie

Présentée et soutenue publiquement par

**DECAUX Olivier**

Le 30 juin 2009, devant le jury ci-dessous

***Président :*** Mr JL. HAROUSSEAU Professeur, Université de NANTES

***Rapporteurs :*** Mr C. DUMONTET Professeur, Université de LYON

Mr T. FACON Professeur, Université de LILLE

***Examineur :*** Mr T. FEST Professeur, Université de RENNES

***Directeurs de thèse :*** Mr H. AVET-LOISEAU et Mr S. MINVIELLE

# PLAN

<b>Abréviations</b> .....	<b>5</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>6</b>
<b>II. Généralités sur le myélome multiple</b> .....	<b>10</b>
<b>II.1 Epidémiologie du myélome multiple</b> .....	<b>10</b>
<b>II.2 Critères diagnostiques du myélome</b> .....	<b>10</b>
II.2.1 Gammopathies monoclonales de signification indéterminée .....	11
II.2.2 Myélome indolent ou asymptomatique .....	12
II.2.3 Myélome multiple symptomatique .....	12
II.2.4 Critères diagnostiques définis par le Groupe International d'étude du myélome .....	13
<b>II.3 Traitement du myélome multiple</b> .....	<b>15</b>
II.3.1 Sujets non éligibles pour une intensification thérapeutique .....	16
II.3.2 Sujets éligibles pour une intensification thérapeutique .....	18
<b>II.4 Survie dans le myélome</b> .....	<b>19</b>
<b>II.5 Réponse au traitement</b> .....	<b>22</b>
II.5.1 Impact de la qualité de la réponse sur la survie des patients traités par traitement intensif avec autogreffe .....	22
II.5.2 Impact de la qualité de la réponse sur la survie des patients traités par chimiothérapie conventionnelle .....	23
II.5.3 Impact de la réponse chez les patients traités avec les nouvelles drogues du myélome .....	24
II.5.3.1 Thalidomide .....	24
II.5.3.2 Bortezomib .....	24
II.5.3.3 Lenalidomide .....	25
II.5.4 Impact des méthodes d'évaluation de la réponse complète .....	25
II.5.5 Impact de la cinétique de la réponse .....	27
II.5.5.1 Traitement intensif avec autogreffe .....	27
II.5.5.2 Autres traitements .....	27
II.5.6 Impact de la progression rapide après réponse initiale .....	28
II.5.7 Questions non résolues .....	29
<b>II.6 Hétérogénéité du myélome</b> .....	<b>30</b>
<b>III. Facteurs pronostiques du myélome multiple</b> .....	<b>32</b>
<b>III.1 Facteurs liés au patient</b> .....	<b>33</b>
III.1.1 Age .....	33
III.1.2 Etat général (performance status) .....	34
III.1.3 Autres facteurs liés au patient .....	34
<b>III.2 Facteurs résultant de l'interaction entre l'hôte et la tumeur</b> .....	<b>34</b>
III.2.1 Taux de beta2 microglobuline sérique .....	34
III.2.2 CRP .....	35
III.2.3 Albuminémie .....	36
III.2.4 Autres facteurs prédictifs .....	36
III.2.5 Classification de Salmon et Durie .....	36
III.2.6 International Staging System (ISS) .....	37
III.2.7 Comparaison de la classification de Salmon et Durie et de l'ISS .....	39
<b>III.3 Facteurs pronostiques liés au clone tumoral</b> .....	<b>40</b>

III.3.1	Capacité de prolifération.....	41
III.3.2	Cytologie.....	41
III.3.3	Phénotype .....	42
III.3.3.1	Description de l'hétérogénéité.....	43
III.3.3.2	Corrélation phénotype et pronostic .....	43
III.3.4	Cytogénétique – analyse en FISH .....	45
III.3.4.1	Description de l'hétérogénéité.....	46
III.3.4.1.1	Translocation impliquant la région 14q32 .....	46
III.3.4.1.2	Hyperdiploïdie .....	48
III.3.4.1.3	Délétion du bras long du chromosome 13 .....	48
III.3.4.1.4	Gains de copies du bras long du chromosome 1 .....	49
III.3.4.1.5	Délétion du bras court du chromosome 17.....	49
III.3.4.1.6	Translocations secondaires .....	50
III.3.4.2	Implications pronostiques .....	50
III.3.4.2.1	Délétion du bras long du chromosome 13 .....	50
III.3.4.2.2	Translocation impliquant la région 14q32.....	51
III.3.4.2.3	Délétion du bras court du chromosome 17.....	52
III.3.4.2.4	Hyperdiploïdie et gains de copies du bras long du chromosome 1.....	52
III.3.4.2.5	Translocations c-myc .....	53
III.3.4.2.6	Poids des différents marqueurs cytogénétiques .....	53
III.3.4.3	Impact des nouvelles drogues du myélome .....	55
III.3.4.4	Impact des anomalies génétiques .....	55
III.3.5	Etude de génomique – puces à ADN .....	56
<b>IV.</b>	<b><i>Génomique transcriptionnelle (Etudes des profils d'expression génique).....</i></b>	<b>58</b>
<b>IV.1</b>	<b>Historique .....</b>	<b>58</b>
<b>IV.2</b>	<b>Types d'analyse utilisés pour l'étude des niveaux d'expression des gènes.....</b>	<b>59</b>
IV.2.1	Analyse non supervisée.....	60
IV.2.2	Analyse supervisée : .....	61
<b>IV.3</b>	<b>Amélioration des connaissances de la physiopathologie des pathologies étudiées .....</b>	<b>63</b>
<b>V.</b>	<b><i>Etude des profils d'expression génique dans le myélome multiple .....</i></b>	<b>64</b>
<b>V.1</b>	<b>Faisabilité et mise en évidence de gènes non reliés à la physiopathologie du myélome .....</b>	<b>64</b>
<b>V.2</b>	<b>Comparaison des plasmocytes malins avec des plasmocytes normaux .....</b>	<b>66</b>
<b>V.3</b>	<b>Premières classifications moléculaires du myélome .....</b>	<b>70</b>
<b>V.4</b>	<b>Compréhension de la transition entre plasmocytes normaux, MGUS et myélome. ....</b>	<b>71</b>
<b>V.5</b>	<b>Recherche de signature d'expression associées au phénotype. ....</b>	<b>73</b>
V.5.1	ARTICLE 1 : Identification de signatures d'expression associées au phénotype. ....	73
V.5.1.1	Résultats .....	73
V.5.1.1.1	Corrélation des profils d'expression génique avec l'isotype.....	73
V.5.1.1.2	Corrélation des profils d'expression génique avec l'existence d'une atteinte osseuse.....	76
V.5.1.2	Commentaires .....	78
<b>COPIE DE L'ARTICLE 1 .....</b>	<b>79</b>	
V.5.2	Mise en évidence de gènes impliqués dans les lésions osseuses du myélome .....	89
<b>V.6</b>	<b>Classifications moléculaires des myélomes.....</b>	<b>90</b>
V.6.1	Classification basée sur l'expression des cyclines .....	90
V.6.2	Classification sur la base des profils d'expression génique.....	91

<b>V.7</b>	<b>Recherche de marqueurs moléculaires prédictifs.....</b>	<b>97</b>
V.7.1	ARTICLE 2– Identification d’un score prédictif de la survie (Score IFM) et basé sur l’expression de 15 gènes .....	97
V.7.1.1	Elaboration d’un score prédictif : .....	98
V.7.1.2	Comparaison du score prédictif avec les biomarqueurs pronostiques habituels.....	99
V.7.1.3	Biologie associée au haut risque.....	100
	<b>COPIE DE L’ARTICLE 2 .....</b>	<b>102</b>
V.7.2	Score UAMS (17 gènes) .....	111
V.7.3	Impact des nouveaux traitements du myélome sur la valeur prédictive du score UAMS .....	114
V.7.4	Poids des marqueurs moléculaires par rapport aux marqueurs pronostiques déjà décrits .....	114
V.7.5	Prédiction de la réponse au bortezomib.....	115
V.7.6	Validation externe des scores prédictifs sur des cohortes indépendantes.....	116
<b>V.8</b>	<b>Etude des mécanismes d’action des traitements, identification de nouvelles cibles thérapeutiques.....</b>	<b>122</b>
V.8.1	Compréhension des mécanismes de réponse et de résistance aux traitements .....	122
V.8.1.1	Dexamethasone : .....	124
V.8.2	Bortezomib.....	125
V.8.3	ARTICLE 3 : Identification d’un gène (REDD1) potentiellement impliqué dans la résistance au bortezomib .....	127
V.8.3.1	Résultats .....	128
V.8.3.2	Commentaires .....	130
	<b>COPIE DE L’ARTICLE 3 .....</b>	<b>132</b>
<b>VI.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>159</b>
<b>VI.1</b>	<b>Apports des analyses de génomique transcriptionnelle .....</b>	<b>161</b>
VI.1.1	Apports des profils d’expression génique par rapport à la cytogénétique .....	161
VI.1.2	Amélioration des connaissances de la physiopathologie du myélome.....	163
VI.1.2.1	Approche gène par gène.....	163
VI.1.2.2	« Gene set enrichment analysis » (GSEA) .....	164
<b>VI.2</b>	<b>Obstacles au développement de ces techniques.....</b>	<b>164</b>
VI.2.1	Obstacles techniques .....	164
VI.2.1.1	Purification des plasmocytes et vérification de la pureté .....	165
VI.2.1.2	Vérification de la qualité de l’ARN, de l’absence de dégradation de l’ARN.....	166
VI.2.1.3	Types de puces.....	168
VI.2.1.4	Vérification de la qualité de l’hybridation .....	170
VI.2.2	Sélection des patients .....	170
VI.2.3	Reproductibilité des résultats ?.....	171
VI.2.4	Question de la comparabilité entre les prédicteurs.....	173
<b>VI.3</b>	<b>Applications en clinique.....</b>	<b>173</b>
VI.3.1	Processus de développement d’un biomarqueur prédictif.....	175
VI.3.2	Exemple du cancer du sein.....	176
VI.3.3	Biomarqueurs et myélome.....	177
VI.3.4	Recommandations internationales .....	181
<b>VI.4</b>	<b>Avenir .....</b>	<b>182</b>
VI.4.1	Analyse des variations du nombre de copies des chromosomes.....	183
VI.4.1.1	Hybridation génomique comparative sur puces (puces-CGH).....	184
VI.4.1.2	Génotypage par analyse des SNP (puces SNP) .....	185
VI.4.1.3	Génomique intégrée.....	189
VI.4.2	Modifications post transcriptionnelles .....	190
VI.4.2.1	Epissage alternatif .....	190

VI.4.2.2	Micro-ARN .....	192
VI.4.3	Prédiction de complications ou d'effets secondaires des traitements. ....	193
VI.4.4	Prédiction du risque de transformation maligne des MGUS et des SMM .....	194
<b>VII.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>196</b>
<b>VIII.</b>	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>199</b>

# Abréviations

CGH	hybridation génomique comparative
EFS	survie sans évènements
FISH	hybridation in situ en fluorescence sur cellules interphasiques
GSEA	gene set enrichment analysis
HSP	heat shock protein
IF	immunofixation
IFM	intergroupe francophone du myélome
IFN	interféron
IPI	index pronostique international
ISS	international staging system
LNHGC	lymphome malin non hodgkinien B à grandes cellules
MGUS	gammopathie monoclonale de signification indéterminée
MM	myélome multiple
MP	melphalan - prednisone
MPT	melphalan - prednisone - thalidomide
MPV	melphalan - prednisone - bortezomib
MRD	maladie résiduelle détectable
nRC	réponse presque complète
PFS	survie sans progression
PS	performans status
RC	réponse complète
RP	réponse partielle
SMM	myélome indolent ou asymptomatique
SNP	single nucleotide polymorphism
TBRP	très bonne réponse partielle
TTP	temps jusqu'à progression
β2m	beta 2 microglobuline

# I. Introduction

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération clonale de plasmocytes malins dans la moelle osseuse (Leleu et al, 2006). Les manifestations cliniques et les complications de la maladie sont très variables d'un patient à l'autre. Certains patients sont asymptomatiques alors que d'autres développent des atteintes osseuses, compliquées de tassements vertébraux, de fractures pathologiques,... L'évolution des patients atteints de myélome est très hétérogène avec des survies allant de quelques mois à plus de 10 ans. Parallèlement à l'hétérogénéité clinique, il existe une grande hétérogénéité biologique. Sous un aspect morphologique homogène, les plasmocytes malins sécrètent des protéines monoclonales différentes d'un patient à l'autre (immunoglobulines complètes, chaînes légères libres,...). Par ailleurs, si tous les plasmocytes présentent des anomalies chromosomiques quantitatives et structurales, leur répartition est très variable d'un patient à l'autre (Avet-Loiseau 2007). L'identification de nouvelles catégories diagnostiques et pronostiques permettant de mieux appréhender le problème de l'hétérogénéité des tumeurs constitue un enjeu majeur dans la prise en charge thérapeutique des cancers.

Depuis plus de 30 ans, des études ont été menées pour essayer d'identifier des facteurs pronostiques permettant de prédire l'évolution des patients (San Miguel et al, 2005). De nombreux facteurs pronostiques ont été décrits, certains sont liés aux caractéristiques des patients, d'autres reflètent la masse tumorale ou sont liés à des caractéristiques du clone tumoral. Cependant, malgré le nombre important de facteurs pronostiques décrits, peu d'entre eux sont utilisés en pratique clinique et l'impact sur la prise en charge des patients est minime. Les marqueurs servent principalement à classer les patients en groupes de risques différents, permettant ainsi de comparer les résultats d'essais cliniques. Ils ne sont pas pris en compte dans les décisions thérapeutiques.

Les progrès des analyses génétiques ont permis depuis quelques années d'améliorer considérablement les connaissances de la physiopathologie du myélome et des mécanismes de transformation maligne. Les études cytogénétiques ont été longtemps difficiles, compte tenu de la faible prolifération des plasmocytes malins. Le développement des techniques d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur cellules interphasiques a rendu possible l'analyse de cellules

plasmocytaires non proliférantes. Par FISH, des anomalies chromosomiques quantitatives et structurales sont été identifiées dans plus de 90 % des myélomes (Decaux et al, 2007). Ces études ont permis de décrire les anomalies chromosomiques les plus fréquemment rencontrées dans le myélome. Les plus fréquentes sont les translocations impliquant le locus 14q32 (notamment le gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines), l'hyperdiploïdie et la délétion du bras long du chromosome 13. Certaines anomalies chromosomiques sont des facteurs pronostiques très puissants. Cependant, les analyses par FISH sont limitées à quelques paramètres par analyse.

De développement récent, les techniques de génomique (dites de « puces à ADN ») permettent une analyse globale au niveau de l'ADN ou de l'ARN. Les premières puces à ADN ont été décrites il y a plus de dix ans (Schena et al, 1995; Schena et al, 1996). Le but était de mesurer chez l'homme l'expression simultanée d'un grand nombre de gènes, voire de l'ensemble des gènes contenus dans le génome. Historiquement, cette approche dite : « à haut débit » consistait à analyser des profils d'expression génique et à les corrélés à des processus biologiques afin de définir des signatures d'expression. Cette approche qualifiée de génomique fonctionnelle a été utilisée avec succès en cancérologie (Alizadeh et al, 2000; van 't Veer et al, 2002; Tonon et al, 2005). Elle a permis d'améliorer la classification des tumeurs, d'étudier les voies d'oncogénèse, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de prédire la survie des patients. Ces techniques d'études des profils d'expression génique ont été développées dans notre unité depuis le début des années 2000. L'objectif principal de nos travaux était de développer des marqueurs moléculaires prédictifs dans le myélome, applicables en clinique. Nos travaux ont été menés en plusieurs étapes :

- 1) Le but de notre première étude était de rechercher si l'hétérogénéité clinique et biologique du myélome était associée à une hétérogénéité moléculaire. Cette étude a été la première à démontrer, dans le myélome, l'existence de corrélations entre des caractéristiques biocliniques et des signatures d'expression génique. Elle a également permis de fournir une explication quant à la gravité accrue de sous types biologiques de myélome (myélome à IgA, myélome sécrétant une chaîne légère est kappa avec atteinte osseuse). Par ailleurs, cette étude nous a permis de vérifier la faisabilité d'études de génomique à grande échelle à partir de prélèvements multicentriques.

2) Pour notre deuxième étude, nous disposions de données évolutives des patients avec un recul suffisant pour étudier la corrélation des données de profils d'expression génique avec la survie. Le but de cette étude était de développer un prédicteur moléculaire de la survie dans le myélome. Nous avons identifié un groupe de 15 gènes dont l'expression était associée à la survie. Un score prédictif résumant l'expression de ces 15 gènes a été établi.

3) Notre troisième étude était plus « fondamentale ». Avec l'arrivée de nouvelles drogues (thalidomide, bortezomib, lenalidomide), la survie des patients atteints de myélome a augmenté au cours des dix dernières années. De ce fait, la prédiction de la survie devient un objectif difficile à atteindre car nécessitant un suivi très prolongé des cohortes de patients. La réponse au traitement étant corrélée à la survie, un objectif alternatif est d'essayer de prédire la réponse ou la non réponse aux traitements. L'identification précoce des patients non répondeurs permettrait une prise en charge thérapeutique individualisée. Une des possibilités est d'étudier la réponse traitement par traitement. Nous avons décidé d'étudier la réponse à la combinaison bortezomib-dexaméthasone qui devrait devenir le traitement d'induction de référence des patients éligibles pour une autogreffe. Lorsque nous avons débuté ce travail, nous ne disposions pas de données évolutives suffisantes chez les patients. Nous avons donc mené un travail préliminaire sur des lignées de myélome pour observer les changements de profils d'expression génique induits par l'exposition des cellules à l'association bortezomib-dexaméthasone. Ce travail nous a permis d'identifier plusieurs gènes dont l'expression est dérégulée par le traitement. Nous avons démontré que l'inhibition de la voie mTOR via l'expression d'un de ces gènes (REDD1) est un mécanisme potentiel de résistance à l'association bortezomib-dexaméthasone. Des études chez les patients sont nécessaires et prévues.

Depuis quelques années, des techniques d'analyse de l'ADN ont été développées permettant la description des variations du nombre de copies d'ADN. Les premiers résultats démontrent que ces techniques permettent d'identifier de nouvelles anomalies chromosomiques ayant un impact pronostique sur la survie des patients (Avet-Loiseau et al, 2009).

Les techniques de génomique sont maintenant arrivées à maturité. L'enjeu est maintenant le transfert de ces résultats de recherche en pratique clinique quotidienne. Les différents obstacles

techniques initiaux ont été surmontés. La standardisation des différentes étapes garantit maintenant une fiabilité et une reproductibilité des résultats. Cependant, le transfert de ces techniques en clinique nécessite un processus rigoureux comparable à celui exigé pour le développement de nouvelles drogues.

## **II. Généralités sur le myélome multiple**

### **II.1 Epidémiologie du myélome multiple**

Le MM est la deuxième hémopathie maligne (après les lymphomes). Il représente environ 15% des hémopathies malignes et 1% des cancers. En France, le MM est responsable de 2% de la mortalité par cancer (tous cancers confondus). Son incidence est de 5-6/100 000 habitants, et environ 3 000 nouveaux cas de MM sont diagnostiqués chaque année en France (Leleu et al, 2006). L'incidence est similaire dans tous les pays développés.

La répartition entre les sexes montre une légère prédominance masculine (Cartwright et al, 2002). La médiane d'âge au moment du diagnostic se situe aux alentours de 70 ans, avec un pic entre 65 – 70 ans. Compte tenu du vieillissement de la population dans les pays développés, le nombre des MM devrait augmenter régulièrement.

Les facteurs favorisant la maladie sont encore mal connus. La prédisposition de la population noire américaine est le seul facteur de risque reconnu avec certitude (Benjamin et al, 2003). Les études américaines et japonaises ont rapporté une incidence plus élevée de MM dans la population exposée aux radiations ionisantes (Shimizu et al, 1990). D'autres facteurs comme les pesticides, le benzène, les solvants organiques, les dérivés du pétrole ou l'obésité ont été évoqués. Néanmoins, leur réel impact reste discutable (Kyle et al, 2007).

### **II.2 Critères diagnostiques du myélome**

Le myélome est souvent précédé par une gammopathie monoclonale de signification indéterminée ou (MGUS pour monoclonal gammopathy of undetermined significance) ou un myélome indolent (SMM pour smoldering myeloma). MGUS et SMM sont deux stades précoces de la maladie, asymptomatiques et ne nécessitent aucun traitement (IMWG 2003). Une surveillance clinique et biologique régulière est nécessaire car MGUS et SMM peuvent évoluer vers un MM symptomatique (Kyle et al, 2002; Kyle et al, 2007).

## II.2.1 Gammopathies monoclonales de signification indéterminée

Les MGUS correspondent à plus de 50 % des cas de gammopathies monoclonales (Kyle et al, 2006; Decaux et al, 2007), et leur fréquence dans la population générale est estimée à 3 % chez les adultes de plus de 50 ans (Kyle et al, 2006). Une MGUS est définie comme une gammopathie monoclonale sans aucun signe clinique ou biologique de myélome, de maladie de Waldenström, d'amylose ou d'une autre hémopathie maligne. Les critères diagnostiques initialement définis par Kyle (Kyle 1978) étaient principalement biologiques :

- taux du composant monoclonal inférieur à 30 g/l (quelque soit le type d'immunoglobuline monoclonale)
- calcémie et créatininémie normales
- protéinurie de Bence-Jones négative ou inférieure à 1 g/24 heures
- plasmocytose médullaire inférieure à 10 %
- absence de lésions osseuses sur les radiologies standard (crâne, humérus, rachis dorsal et lombaire, bassin, fémurs)
- suivi évolutif supérieur à 1 an

Lorsque le patient est asymptomatique et que le taux de composant monoclonal est inférieur à 15 g/l, le myélogramme et les radiographies osseuses ne sont pas indispensables (Blade 2006).

Les MGUS correspondent à de véritables états pré-tumoraux pouvant évoluer vers une hémopathie maligne. Le potentiel évolutif des MGUS a été parfaitement identifié par Kyle dès 1978 (Kyle 1978). Il a décrit l'évolution d'une cohorte de 241 patients avec un suivi de plus de 5 ans et observé 11% d'évolution vers une hémopathie maligne. Afin de confirmer ces données, Kyle a étudié rétrospectivement une cohorte de 1384 patients suivis pour une MGUS (Kyle et al, 2002). Avec une durée médiane de suivi de 15,4 ans, 115 patients (8 %) ont développé une hémopathie maligne. Le risque actuariel de transformation maligne était estimé dans cette population à environ 1% par an. Il persistait avec le temps. Le risque relatif de développer un myélome était estimé à 25, une maladie de Waldenström à 46, une amylose à 8,4 et un lymphome malin non hodgkinien à 2,4. Pour les MGUS IgG et IgA, le principal risque évolutif est le myélome multiple. Par ailleurs, deux études récentes ont démontré que plus de 90% des myélomes sont précédés par une MGUS (Landgren et al, 2009; Weiss et al, 2009).

## **II.2.2 Myélome indolent ou asymptomatique**

Le SMM ou myélome asymptomatique est un myélome qui ne s'accompagne d'aucune complication clinique ou biologique (IMWG 2003). Il correspond à environ 15% des MM. Le SMM représente un stade intermédiaire entre MGUS et MM symptomatique. Les SMM doivent être distingués des MGUS car ils ont un risque d'évolution vers un MM symptomatique plus important. Kyle a décrit le suivi rétrospectif d'une cohorte de 276 patients ayant un SMM répondant aux critères définis par le Groupe International d'étude du Myélome (Kyle et al, 2007). La durée médiane de suivi était de 6,1 ans (0 – 29 ans). Pendant cette période, 158 (57%) des patients ont évolué vers un myélome symptomatique et 5 (2%) ont développé une amylose. Le risque actuariel de progression vers un myélome symptomatique ou une amylose était estimé à 10% par an pendant les 5 premières années, puis diminuait avec le temps. Il était estimé à 72% à 20 ans. Le risque relatif de développer un myélome symptomatique ou une amylose était estimé respectivement à 522 et 50 par rapport à la population générale.

## **II.2.3 Myélome multiple symptomatique**

Le MM s'accompagne fréquemment d'un envahissement des structures osseuses responsables de douleurs osseuses, de tassements vertébraux, de fractures pathologiques et d'une hypercalcémie, de cytopénies (Kyle et al, 2004). Parfois, le clone plasmocytaire envahit d'autres organes donnant des manifestations systémiques. Le clone plasmocytaire produit une protéine monoclonale correspondant, soit à une immunoglobuline monoclonale intacte, soit à l'un de ses fragments. Ce composant monoclonal peut être responsable d'insuffisance rénale aiguë par toxicité des chaînes légères libres d'immunoglobulines ou d'un syndrome d'hyperviscosité. Les myélomes à immunoglobuline intacte sont les plus fréquents (80 % environ). L'isotype est IgG dans 56% des cas, IgA dans 26% et plus rarement IgD, E ou encore M. Dans environ 20% des cas, le composant monoclonal est une chaîne légère (myélome multiple à chaînes légères). Rarement, le clone plasmocytaire ne sécrète aucun composant monoclonal, on parle alors de MM non sécrétant (2-3% des cas) (Kyle et al, 2003). Les manifestations cliniques et biologiques les plus fréquentes observées dans une cohorte rétrospective de 1 027 patients sont résumées dans le tableau 1.

<i>Clinical/laboratory features</i>	<i>Proportion of patients with abnormality (%)</i>
Anemia < 12 g/100 ml	72
Bone lesions (lytic lesions, pathologic fractures or severe osteopenia)	80
Renal failure (serum creatinine $\geq$ 2 mg/100 ml)	19
Hypercalcemia ( $\geq$ 11 mg/100 ml)	13
Monoclonal protein on serum protein electrophoresis	82
Monoclonal protein on serum protein immunofixation	93
Monoclonal protein on serum plus urine protein immunofixation (or serum immunofixation plus serum free light chain assay)	97
<i>Type of M protein</i>	
IgG	52
IgA	21
Light chain only	16
Increased $\geq$ 10% clonal bone marrow plasma cells	96

**Tableau 1 : Manifestations cliniques et biologiques au diagnostic de myélome dans une cohorte de 1 027 patients (d'après (Kyle et al, 2003)).**

#### **II.2.4 Critères diagnostiques définis par le Groupe International d'étude du myélome**

Le diagnostic de MM est basé sur la mise en évidence d'une protéine monoclonale dans le sang ou dans les urines, d'une infiltration plasmocytaire médullaire et de complications cliniques ou biologiques. La distinction entre MGUS, SMM et myélome est parfois difficile, notamment en l'absence de manifestations cliniques. Les critères diagnostiques de MM communément admis étaient ceux du SWOG. Ils étaient basés sur la plasmocytose médullaire, le taux du composant monoclonal sérique ou urinaire, le taux des immunoglobulines polyclonales et les radiographies osseuses. Une nouvelle classification a été proposée en 2003 par le Groupe International d'étude du Myélome (IMWG pour International Myeloma Working Group) (IMWG 2003) et permet de simplifier la distinction entre MGUS, SMM et MM (tableau 2). Elle fait appel à la plasmocytose médullaire, au taux de composant monoclonal sérique et à l'existence d'atteintes organiques (anémie < 10 g/dL, insuffisance rénale avec créatininémie > 173  $\mu$ mol/L, hypercalcémie > 2,75 mmol/L, lésions osseuses lytiques, tassements vertébraux, amylose, infections répétées,...). MGUS et SMM sont asymptomatiques et ne s'accompagnent d'aucune atteinte organique. Leur

distinction est biologique, basée sur le taux du pic d'immunoglobuline et sur la plasmocytose médullaire.

- Les MGUS sont définies par un taux de composant monoclonal inférieur à 30 g/l et une plasmocytose médullaire inférieure à 10%.
- Le diagnostic de SMM est retenu si le taux du composant monoclonal est supérieur à 30 g/l et/ou si la plasmocytose médullaire est supérieure à 10 %.
- Le diagnostic de MM symptomatique est retenu lorsque la plasmocytose médullaire est supérieure à 10% et qu'il existe des complications (anémie, insuffisance rénale, hypercalcémie, lésions osseuses, infections bactériennes à répétition,), quelque soit le taux du composant monoclonal.

	<b>MGUS</b>	<b>SMM</b>	<b>MM symptomatique</b>
<b>Taux du composant monoclonal</b>	<30 g/l	>30 g/l	Pas de valeur seuil
<b>Plasmocytose médullaire</b>	<10%	>10%	> 10%
<b>Atteinte organique *</b>	-	-	+
	Absence d'arguments clinique et biologique pour une hémopathie maligne B		
	Tous les critères nécessaires	Un seul critère nécessaire	

**\* Atteinte organique**

<b>Hypercalcémie</b>	>0,25 mmol/l par rapport à normale >2,75 mmol/l
<b>Insuffisance rénale</b>	Créatininémie >173 mmol/l
<b>Anémie</b>	Hémoglobine <2 g/dl par rapport à normale Hémoglobine <10 g/dl
<b>Lésions osseuses</b>	Lacunes osseuses Ostéoporose avec fracture pathologique compressive
<b>Autres</b>	Syndrome d'hyperviscosité Amylose Infection bactérienne à répétition (>2 épisodes en 12 mois)

**Tableau 2 : Résumé des critères diagnostiques définis par le Groupe International d'Etude du Myélome (d'après (IMWG 2003)).**

### II.3 Traitement du myélome multiple.

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

C'est en 1969 qu'Alexanian (Alexanian et al, 1969) a décrit le protocole associant melphalan (0,25 mg/kg/j pendant 4 jours) - prednisone (2 mg/kg/jour pendant 4 jours) par cycles de 6 semaines (MP). Plusieurs schémas de polychimiothérapie ont été, depuis, proposés. Une méta-analyse publiée en 1998 a repris 27 essais randomisés (6 633 patients) comparant des protocoles de polychimiothérapie au MP (Myeloma Trialists' Collaborative Group 1998). Le taux de réponse était meilleur avec la polychimiothérapie (60,2% contre 53,2%) mais la survie n'était pas améliorée par la polychimiothérapie (survie à 5 ans 24,4% contre 23%). Ainsi, le protocole MP est resté pendant plusieurs décennies le traitement de référence du myélome multiple particulièrement chez les patients de plus de 65 ans.

Chez les patients plus jeunes, le traitement intensif par fortes doses de melphalan a été proposé pour la première fois en 1973 (Shibata et al, 1973). Dix ans plus tard, McElwain (McElwain et al, 1983) a publié la première série de patients (8 cas de myélome et 1 cas de leucémie à plasmocytes) traités par de fortes doses de melphalan par voie intraveineuse. Il a observé trois réponses complètes et une survie prolongée chez ces patients réfractaires à la chimiothérapie conventionnelle. D'autres auteurs ont confirmé l'obtention de réponse après fortes doses de melphalan chez des patients réfractaires ou en rechute après traitement conventionnel (Barlogie et al, 1988; Lokhorst et al, 1992). La toxicité était essentiellement hématologique avec des durées de neutropénie variant de 24 à 36 jours. Pour pallier à cette toxicité hématologique, il a été rapidement envisagé d'associer au traitement par fortes doses de melphalan la réinjection de cellules souches hématopoïétiques autologues. Barlogie a rapporté successivement en 1986 et 1987 les premiers cas de traitement intensif avec autogreffe de moelle chez des patients traités par respectivement melphalan seul (Barlogie et al, 1986), puis melphalan en association à une irradiation corporelle totale (Barlogie et al, 1987). Le traitement intensif associé à une autogreffe

de cellules souches a définitivement prouvé sa supériorité par rapport à la polychimiothérapie en 1996 (Attal et al, 1996). Le protocole VAD (vincristine, doxorubicine, dexaméthasone) décrit en 1984 (Barlogie et al, 1984) est rapidement devenu le traitement d'induction de référence avant intensification.

Depuis 1998, le paysage thérapeutique s'est enrichi de trois nouveaux traitements participant au net allongement de l'espérance de vie des patients. Ces trois médicaments sont le thalidomide, le bortezomib (ou Velcade®) et le lenalidomide (ou Revlimid®) analogue du thalidomide avec un profil de toxicité différent. Ces 3 traitements contribuent à améliorer la prise en charge des patients à la fois dans les situations de rechutes mais également en première ligne. Ils ont d'ores et déjà bouleversé la prise en charge thérapeutique du MM. Leur efficacité en situation de rechute, initialement en monothérapie ou plus généralement en association avec la dexaméthasone, est définitivement démontrée et s'accompagne pour les patients non seulement d'un gain en survie sans progression mais également d'une amélioration de la survie globale (Barlogie et al, 2001; Yakoub-Agha et al, 2002; Richardson et al, 2003; Rajkumar et al, 2005; Richardson et al, 2005; Dimopoulos et al, 2007; Weber et al, 2007). Ce bénéfice n'est pas obtenu au prix d'une toxicité démesurée et ces résultats ouvrent la voie vers des possibilités d'associations multiples avec les agents de chimiothérapie et/ou de ces nouvelles molécules entre elles. Des associations incluant un ou plusieurs de ces nouveaux traitements ont été proposées et testées en première ligne.

### **II.3.1 Sujets non éligibles pour une intensification thérapeutique**

Plusieurs essais de phase III ont récemment démontré la supériorité des schémas melphalan-prednisone-thalidomide (MPT) et melphalan-prednisone-bortezomib (MPV) par rapport au schéma conventionnel melphalan-prednisone (MP). Une étude prospective randomisée à 3 bras a été menée par l'IFM (protocole IFM 99-06) (Facon et al, 2007). Elle avait pour but de comparer 3 stratégies thérapeutiques chez des patients âgés de 65 à 75 ans, en première ligne de traitement : (1) le traitement de référence par melphalan-prednisone (MP) – 12 cures à 6 semaines d'intervalle, (2) l'association MP thalidomide (MPT) avec des doses croissantes de thalidomide (en moyenne 200 mg/jour) en fonction de la tolérance, (3) une stratégie intensive atténuée, adaptée à l'âge des patients (traitement d'induction par 2 cures de VAD suivi de 2 intensifications thérapeutiques par melphalan 100 mg/m<sup>2</sup> associé à une autogreffe). L'objectif principal de l'étude

était la survie globale. Quatre cent quarante-sept patients ont été randomisés. La survie globale médiane des patients traités dans le bras MPT, estimée à 51,6 mois, était significativement supérieure à celle des patients traités par MP (33,2 mois) et par stratégie intensive (38,3 mois). La survie sans progression était également supérieure dans le bras MPT (médiane 27.5 mois contre 17.8 et 19.4 mois). Aucune différence n'était observée entre le bras MP et le bras intensif en terme de survie. Le taux de réponse à un an était supérieur dans les bras MPT (76%), intensif (65%) par rapport au bras MP (35%). La toxicité était comparable à celle observée dans une étude italienne (Palumbo et al, 2006) avec, notamment, un taux d'accidents thrombotiques estimé à 12% dans le groupe traité par MPT (contre 4% dans le bras MP et 8% dans le bras intensif). Le taux de constipation sévère et de somnolence était estimé respectivement à 10% et 8% dans le groupe MPT. Le schéma MPT a également été comparé au schéma conventionnel MP chez des sujets de plus de 75 ans dans un essai en double aveugle mené par l'IFM (IFM 01-01) (Hulin et al, 2007). Tous les patients étaient traités par melphalan (0,2 mg/kg J1-J4) et prednisone (2 mg/kg J1- J4) avec 12 cycles de 6 semaines associés à un placebo (bras MP) ou à du thalidomide à la dose de 100 mg/j (bras MPT). Le critère de jugement principal était la survie globale. Deux cent vingt neuf patients ont été inclus. La survie globale était supérieure dans le bras MPT par rapport au groupe MP (médiane 44 mois contre 29,1 mois). La survie sans progression était également supérieure dans le groupe MPT (médiane 24,1 mois contre 18,5 mois). Le taux de réponse était de 62% dans le bras MPT contre 31% dans le bras MP.

Une étude randomisée internationale (VISTA) de phase III a comparé le classique MP à l'association MP plus bortezomib (MPV) (San Miguel et al, 2008). Six cent quatre vingt deux patients ont été inclus. Le taux de réponse était supérieur dans le bras MPV (71% contre 35%). Le temps jusqu'à progression (TTP) était plus long dans le bras MPV (24 mois contre 16,6 mois). Avec un suivi médian de 16,3 mois, 45 patients (13%) étaient décédés dans le bras MPV et 76 (22%) dans le bras MP. Il existait une différence de survie significative ( $p=0,008$ ). La médiane de survie n'était atteinte dans aucun des deux groupes.

Chez les sujets non éligibles pour une intensification thérapeutique, il existe donc actuellement deux schémas de traitement possibles : MP+thalidomide et MP+bortezomib. D'autres combinaisons sont en cours d'évaluation et notamment l'association lenalidomide + faibles doses de dexaméthasone.

### **II.3.2 Sujets éligibles pour une intensification thérapeutique**

Pour les patients de moins de 65 ans, la base du traitement repose sur une intensification par fortes doses de melphalan, soutenue par autogreffe de cellules souches périphériques et précédée d'un traitement d'induction par chimiothérapie selon le protocole VAD. Cette stratégie a montré un bénéfice en terme de réponse, de survie globale et de survie sans événement. Cependant, malgré les progrès réalisés depuis l'introduction de l'autogreffe, la médiane de survie reste faible (moins de 5 ans). La survie n'est pas seulement liée aux facteurs pronostiques initiaux mais également à l'intensité de la réponse. Si la place de l'autogreffe n'est pas, pour le moment, remise en cause, il paraît possible d'améliorer les différentes phases du traitement. Ainsi, de nouveaux protocoles de traitement d'induction et de conditionnement sont proposés.

En ce qui concerne le traitement d'induction, un essai récent de l'IFM (IFM 05-01) a comparé le protocole bortezomib – dexaméthasone au VAD dans le traitement d'induction du myélome des patients de moins de 65 ans (Harousseau et al, 2008). Quatre cent quatre vingt deux patients ont été inclus. Les résultats montraient une supériorité du bras bortezomib – dexaméthasone en terme de réponse au traitement avant et après autogreffe. Après autogreffe, le taux de réponse complète (RC) ou presque complète (nRC) était de 39,6% dans le bras bortezomib – dexaméthasone et 21,7% dans le bras VAD ( $p=0.001$ ). Le taux de très bonne réponse partielle (TBRP) était respectivement 61,4% et 44%. ( $p=0.0007$ ). Par ailleurs, la survie sans progression était significativement meilleure après traitement d'induction par bortezomib-dexaméthasone avec une PFS médiane non atteinte contre 29 mois après VAD (PFS à 2 ans 69% contre 60%). En revanche, il n'y a, pour le moment, pas de différence en terme de survie globale entre les deux bras. Ce protocole était bien toléré et n'a eu de conséquences négatives ni sur le recueil de cellules souches ni sur la faisabilité de l'autogreffe dans les suites.

Au vu de ces résultats, le protocole bortezomib – dexaméthasone devrait devenir le traitement d'induction de référence chez les patients de moins de 65 ans éligibles pour un traitement intensif.

## II.4 Survie dans le myélome

A ce jour, malgré les progrès thérapeutiques récents, le myélome multiple reste une maladie incurable. Kyle a décrit une cohorte rétrospective de 1 027 patients atteints de MM traités à la Mayo Clinic, la durée médiane de survie après le diagnostic était de 33 mois (Kyle et al, 2003). Les patients avaient été diagnostiqués entre 1985 et 1998 et aucune amélioration de la survie n'a été observée entre 1985 et 1998. Cependant, compte tenu des dates de diagnostic dans cette cohorte, peu de patients ont pu bénéficier des nouveaux traitements du myélome.

Dernièrement, 3 études ont montré une amélioration récente de la survie des patients atteints de myélome. Une étude suédoise de Kristinnson montrait une amélioration continue de la survie sur une période de 30 ans (1973-2003), principalement chez les sujets de moins de 60 ans (Kristinnson et al, 2007). Brenner a étudié les données d'un registre national des cancers aux Etats-Unis et identifié 26 523 patients ayant un myélome diagnostiqué entre 1980 et 2004 (Brenner et al, 2008). Il a observé une augmentation de la survie entre 1990-1992 et 2002-2004 avec une survie à 5 ans augmentant de 11,1% à 17,4% et une survie à 10 ans augmentant 28,8% à 34,7%. L'augmentation la plus marquée était chez les patients âgés de moins de 50 ans et de 50 à 59 ans avec une amélioration de la survie à 10 ans estimée respectivement de 16,8% et 11,4%. A l'inverse, aucune amélioration n'était observée chez les patients âgés de plus de 70 ans (figure 1).

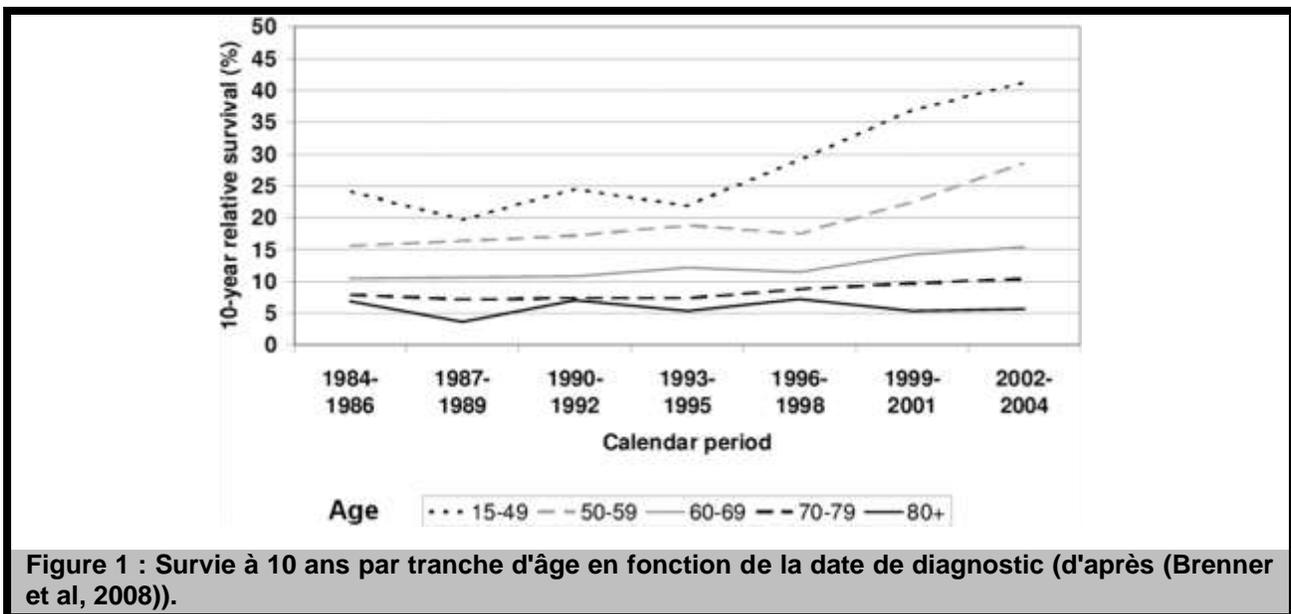


Figure 1 : Survie à 10 ans par tranche d'âge en fonction de la date de diagnostic (d'après (Brenner et al, 2008)).

Quelque soit l'âge, aucune amélioration de la survie n'était observée entre 1984 et 1995. L'amélioration de la survie a débuté entre 1993 et 1996 pour les patients de moins de 50 ans et entre 1996 et 1999 pour les patients âgés de 50 à 59 ans. Dans ces deux études, les auteurs attribuaient les progrès de la survie à l'introduction des traitements intensifs avec autogreffe. Ces 2 études étaient trop précoces pour pouvoir observer les effets des nouveaux traitements du myélome.

Kumar a étudié les données évolutives de 2 981 patients vus à la Mayo Clinic sur une période de 36 ans (entre janvier 1971 et décembre 2006) (Kumar et al, 2008). La survie médiane des 1 051 patients pris en charge dans les dix dernières années (à partir de janvier 1997) était supérieure à celle des patients traités avant 1997 (respectivement 44,8 et 29,9 mois). Ce bénéfice était observé quelque soit le score ISS. Les patients ont été séparés en 6 groupes correspondant à des périodes de 6 ans. Alors qu'aucune amélioration de la survie n'était observée pendant environ 25 ans, une tendance positive était observée à partir de la période 1995-2000 et une augmentation significative de la survie a été observée sur les 6 dernières années (2001-2006). Comme dans les études précédentes, le bénéfice de survie concernait principalement les patients âgés de moins de 65 ans. Ainsi la médiane de survie augmentait de 33 à 60 mois pour les patients de moins de 65 ans et de 32 à 26 mois pour les patients de plus de 65 ans (figure 2).

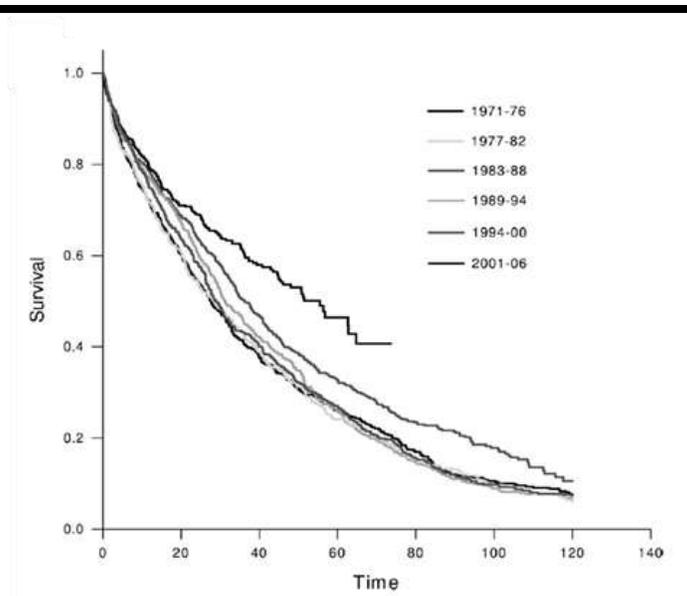
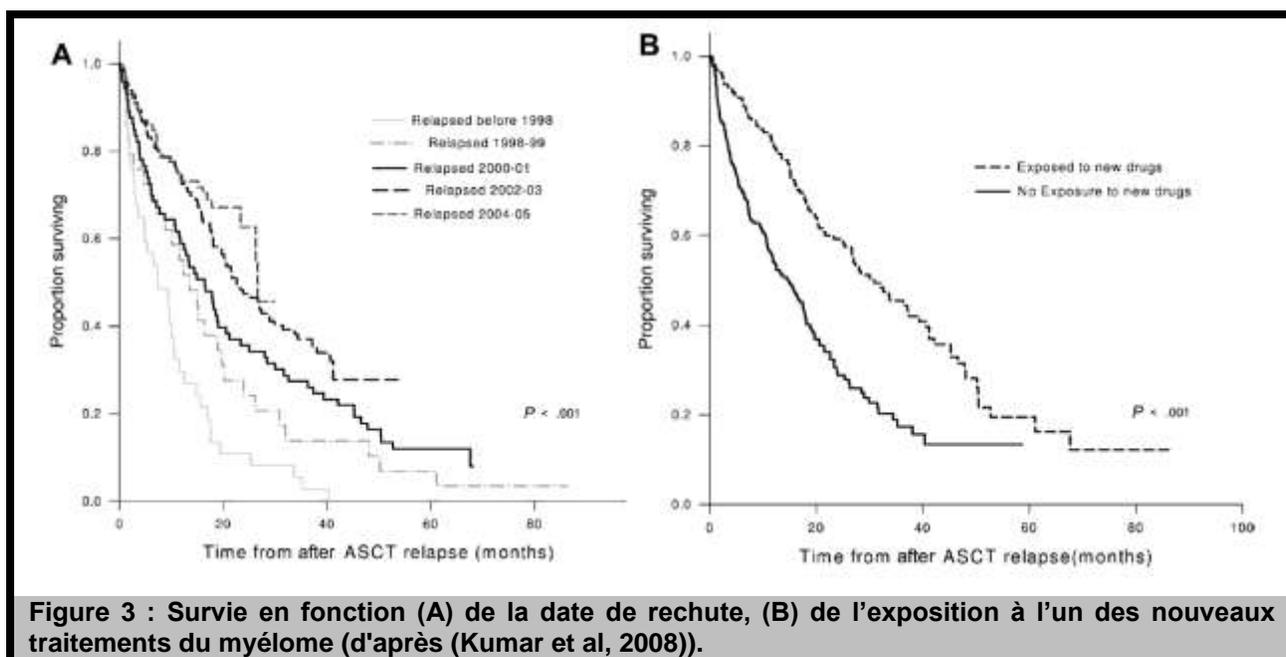


Figure 2 : Survie en fonction de la date de diagnostic (d'après (Kumar et al, 2008)).

Dans le même article, Kumar a étudié une cohorte de 387 patients en rechute après autogreffe. Il a également observé une amélioration de la survie au cours de la dernière décennie. La survie médiane des patients ayant rechuté après 2000 était meilleure que celle des patients ayant rechuté avant 2000 (30,9 mois contre 14,8 mois) (figure 3A). Par ailleurs, les 161 (41%) patients ayant reçu un des nouveaux traitements du myélome en traitement de la rechute avaient une médiane de survie plus élevée (30,9 mois) que les patients n'ayant pas bénéficié de ces traitements (14,8 mois) (figure 3B).



Ces données illustrent l'impact positif de l'intensification thérapeutique avec autogreffe et des nouveaux traitements du myélome sur l'évolution de la maladie. Cependant, il est possible que les bénéfices de survie observés soient également, en partie, liés à l'amélioration des soins de support au cours des dernières années.

Il est important de noter que, pour le moment, l'amélioration de la survie dans le myélome a surtout été observée chez les patients de moins de 65 ans. Il est probablement encore trop tôt pour pouvoir observer les effets bénéfiques des nouveaux traitements des myélomes chez les patients de plus de 65 ans. Les résultats des essais ayant comparé les associations MPT et MPV au classique MP laisse espérer l'apparition à court terme d'un bénéfice de survie chez ces patients.

Compte tenu de l'augmentation importante de la survie, il devient difficile d'utiliser la survie globale comme critère de jugement principal dans les essais cliniques car cela imposerait un suivi très prolongé. La survie sans progression (PFS) va devenir un critère de jugement important.

## **II.5 Réponse au traitement**

L'impact de la réponse au traitement est bien établi dans la majorité des hémopathies malignes. Initialement, dans le myélome, il n'y avait pas d'étude sur l'impact de la réponse car avant l'avènement de l'autogreffe, très peu de patients arrivaient à obtenir une réponse complète (RC).

### **II.5.1 Impact de la qualité de la réponse sur la survie des patients traités par traitement intensif avec autogreffe**

Le protocole IFM 90 qui a établi la supériorité de l'autogreffe par rapport à la chimiothérapie conventionnelle a été le premier à montrer que la RC et la très bonne réponse partielle (TBRP) s'accompagnaient d'une survie à 5 ans prolongée (Attal et al, 1996). Sur les 178 patients ayant survécu au moins un an, la survie à 5 ans des 51 patients ayant obtenu au moins une TBRP (TBRP ou RC) était estimée à 72% contre 39% pour les 81 patients ayant une réponse partielle (RP) ou minime et 0% pour les 48 patients non répondeurs. Dans l'étude IFM 94-02 ayant démontré la supériorité d'une double autogreffe par rapport à une autogreffe unique, 349 patients survivant après un an ont été évalués. La réponse maximale au traitement était un facteur indépendant associé à la survie (Attal et al, 2003). La survie des patients en RC ou en réponse presque complète (nRC) était identique. Cela a été confirmé sur une étude portant sur les 849 patients inclus dans les essais IFM 99. Les patients en RC et nRC avaient une survie globale et une survie sans événement (EFS) plus longues que les patients ayant obtenu une TBRP ou une RP (Harousseau et al, 2006).

Lahuerta a étudié une cohorte de 344 patients (dont 202 traités en première ligne) traités par intensification autogreffe (Lahuerta et al, 2000). Il a montré que les patients ayant une RC avec immunofixation (IF) négative avaient une meilleure EFS (35% à 5 ans) et survie globale (72% à

5 ans) que les patients ayant une RC avec IF positive, une TBRP ou une RP. Pour ces patients l'EFS à 5 ans était respectivement 30%, 27% et 15% et la survie à 5 ans 48%, 42% et 41%.

Van de Velde a effectué une méta analyse de 21 études (10 prospectives et 11 rétrospectives) qui ont étudié le devenir de 4 990 patients traités par autogreffe en fonction de l'intensité de la réponse au traitement (van de Velde et al, 2007). L'objectif de cette étude était de comparer le devenir des patients ayant au moins une TBRP aux autres patients. La méta analyse a confirmé un lien entre la réponse maximale avant ou après autogreffe et la survie. La relation entre réponse maximale et survie globale ou EFS était hautement significative pour les essais prospectifs et rétrospectifs ( $p < 0,0001$ ). La réponse maximale avant autogreffe était également associée à la survie et à l'EFS ( $p = 0,0015$  et  $< 0,00001$ ).

### **II.5.2 Impact de la qualité de la réponse sur la survie des patients traités par chimiothérapie conventionnelle**

Dans beaucoup d'études, il n'y a pas eu d'analyse spécifique de la survie en fonction de la réponse. Néanmoins, quand le pourcentage de RC augmentait dans les essais, la survie augmentait.

Sur une cohorte de 243 patients traités par chimiothérapie conventionnelle, Blade a observé un taux de réponse de 50,1% (Blade et al, 1994). La survie des patients répondeurs était meilleure que celle des non répondeurs avec une survie médiane à 43 mois contre 19 mois. En revanche, il n'a pas observé d'impact de la qualité de la réponse.

Dans une étude de Kyle portant sur 628 patients inclus dans des essais de l'ECOG sans autogreffe (Kyle et al, 2006), la survie médiane (mesurée à partir de 2 ans après l'inclusion) était plus importante chez les patients en RC que les chez les patients en RP (3,9 ans contre 2,4 ans  $p = 0,006$ ). Cependant, probablement à cause du faible nombre de RC obtenues (85 patients – 14%), la RC n'était pas identifiée comme facteur pronostique indépendant en analyse multivariée. Parmi les patients en RC, 32 avaient bénéficié d'une IF (21 IF- et 11 IF+). La survie après atteinte de la RC était plus longue en cas d'IF négative (médiane de survie 6,6 ans contre et 4,4 ans) ainsi que la durée de réponse (3,8 ans contre 2,9 ans  $p = 0,005$ ).

Durie a étudié 1 555 patients inclus dans 4 essais du SWOG basés sur des chimiothérapies conventionnelles (Durie et al, 2004). La survie globale et l'EFS des patients étaient identiques quelque soit la qualité de la réponse. Cependant, dans cette étude, les critères de réponse utilisés étaient ceux du SWOG. Les patients étaient considérés comme répondeurs en cas de diminution de plus de 50% ou de plus de 75% du pic. Ainsi, les patients très bons répondeurs (RC et TBRP) n'étaient pas individualisés. L'impact de la RC et de la TBRP ne pouvait donc pas être mis en évidence dans cette étude.

### **II.5.3 Impact de la réponse chez les patients traités avec les nouvelles drogues du myélome**

Peu d'études spécifiques ont été menées. Cependant, l'ajout des nouvelles drogues s'accompagne de taux de réponses plus importants et de gains de survie. Ces résultats suggèrent donc que la réponse au traitement a également un impact pronostique important chez les patients traités avec ces nouvelles drogues.

#### ***II.5.3.1 Thalidomide***

Dans un essai de phase II comparant une association thalidomide–doxorubicine liposomale–vincristine à la dexaméthasone chez des patients en première ligne ou en rechute, Hussein a observé que les patients en RC et TBRP avaient une PFS et une survie globale prolongée par rapport aux patients en RP ou stables quelque soient le traitement et la ligne traitement (Hussein et al, 2006).

#### ***II.5.3.2 Bortezomib***

Dans l'essai de phase II SUMMIT (Richardson et al, 2003), les patients étaient traités en rechute par bortezomib (plus dexaméthasone si progression ou stabilité). Parmi les 193 patients évaluables, 67 patients étaient répondeurs dont 7 (4%) RC, 12 (6%) nRC, 34 (18%) RP et 14 (7%) réponses minimales. La durée médiane de survie sans progression était 13,9 mois pour les patients répondeurs et 1,3 mois pour les patients en progression. La médiane de survie était non atteinte après 23 mois de suivi pour les patients répondeurs et de 8 mois pour les patients en progression. Par ailleurs, la médiane survie sans progression était plus longue chez les patients en RC/nRC (16,4 mois) que chez les patients en RP (9,2 mois).

Dans l'essai de phase III APEX (Richardson et al, 2005) comparant le bortezomib à la dexaméthasone en monothérapie chez des patients en rechute, 315 patients étaient évaluable pour la réponse au bortezomib. Le taux de réponse était de 43%, dont 9% de RC et 10% de TBRP. Dans cette étude, la qualité de la réponse n'avait pas d'impact sur la survie globale mais un impact sur le temps sans traitement. Les patients en RC avaient un temps sans traitement et un temps avant traitement alternatif plus prolongé que les patients en TBRP ou RP.

Une analyse a été menée sur les 682 patients inclus dans le protocole VISTA (San Miguel et al, 2008) en utilisant les critères de l'IMWG (Durie et al, 2006) (alors que les critères de réponse utilisés dans la publication étaient ceux de l'EBMT). Les patients ayant une RC avaient un bénéfice en terme de TTP et de survie globale par rapport aux patients en RP et un bénéfice de TTP par rapport aux patients en TBRP.

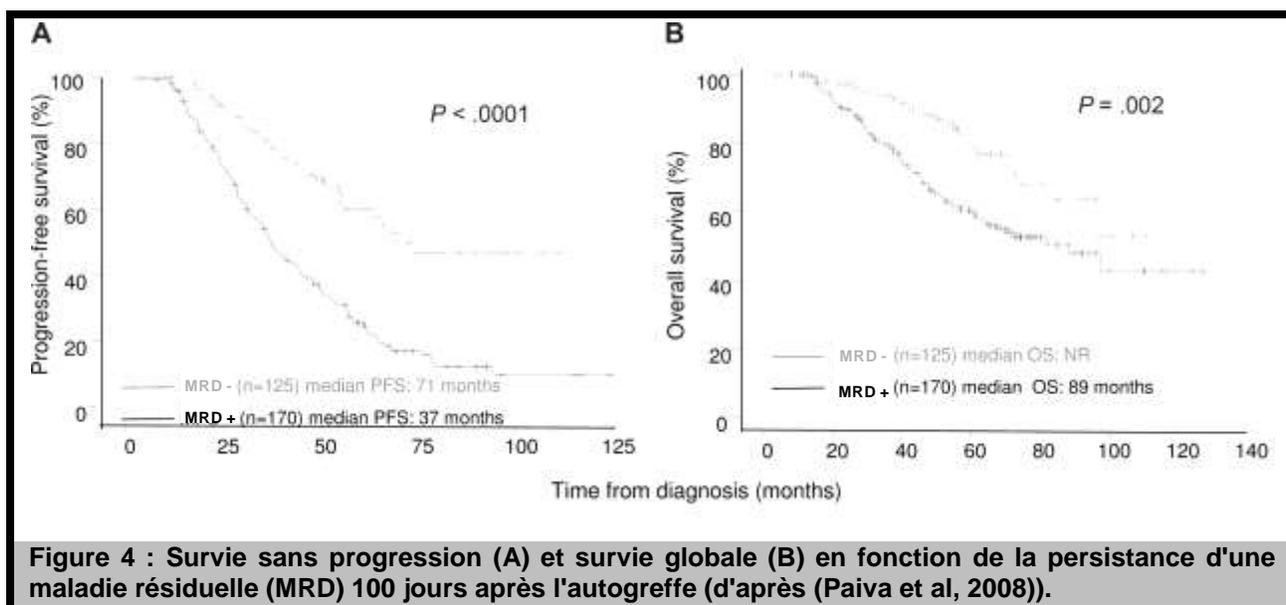
### ***II.5.3.3 Lenalidomide***

Deux essais récents ont montré la supériorité de l'association légalidomide-dexaméthasone par rapport à la dexaméthasone chez des patients en rechute (Dimopoulos et al, 2007; Weber et al, 2007). Sur les 353 patients analysés, 214 (61%) ont eu une réponse (86 RC/nRC et 128 PR). Le TTP et la survie globale étaient plus longs chez les patients en RC/nRC que chez les patients en RP. Par ailleurs, le taux de rechutes était plus faible (38% contre 43%). La réponse n'est pas le seul critère puisque, dans ces études, les patients ayant eu un traitement prolongé plus de 10 mois quelque soit la réponse (en prenant y compris les 107 maladies stables), avaient une survie 24 mois après atteinte de la meilleure réponse plus longue (93,8% vs 48,4%).

### **II.5.4 Impact des méthodes d'évaluation de la réponse complète**

La définition de la RC implique une électrophorèse normale est une IF négative. Cependant, l'impact de l'analyse de la maladie résiduelle est important et prédictif dans de nombreuses hémopathies malignes : leucémie myéloïde chronique, LAM, LAL, LA promyélocytaire, LLC, ... L'équipe de San Miguel a étudié récemment l'impact de l'étude de la maladie résiduelle en cytométrie sur la survie des patients (Paiva et al, 2008). Deux cent quatre vingt quinze patients inclus dans le protocole GEM2000 (comprenant une autogreffe) ont été évaluées à J100 après l'autogreffe par cytométrie en flux à la recherche d'une maladie résiduelle détectable (MRD). La

recherche de MRD était positive chez 147 (50%) des patients et négative chez 125 (42%). La PFS et la survie globale des patients ayant une MDR étaient plus courtes que celles des patients sans MRD (PFS à 5 ans 22% contre 60%  $p < 0,001$ ) (survie à 5 ans 60% contre 82%  $p = 0,002$ ) quelque soit le niveau de réponse (figure 4). Parmi les 147 patients en RC, 94 n'avaient pas de MRD et 53 avaient une MRD. Dans ce groupe de patients en RC, la présence d'une MRD était également associée à une diminution de la PFS et de la survie globale (PFS à 5 ans 30% contre 62%  $p < 0,001$ ) (Survie à 5 ans 59% contre 87%  $p = 0,009$ ).



Par ailleurs 31 patients n'avaient pas de MRD détectable malgré la persistance d'une positivité de l'IF. Ces patients avaient également une PFS et une survie plus longue que les patients ayant la même réponse mais avec une MRD positive. Les patients n'ayant pas de MRD avaient une PFS et une survie plus prolongée (quelque soit le résultat de l'IF) que les patients ayant une MRD positive et une IF négative, ce qui suggère que la MRD a un impact plus important que l'IF sur le devenir des patients. En analyse multivariée, les facteurs prédictifs indépendants de la PFS étaient la MRD (HR 3,64) et la présence d'une hyperdiploïdie par FISH (HR 1,79). Pour la survie globale, les seuls facteurs indépendants étaient la MRD (HR 2,02) et l'âge (HR 1,63).

Cette étude suggère que l'évaluation de la MRD est un facteur prédictif important de survie et de PFS dans le myélome. Cependant, cette étude doit être confirmée sur une cohorte indépendante et

chez des patients traités par chimiothérapie conventionnelle ou par les nouvelles drogues du myélome.

## **II.5.5 Impact de la cinétique de la réponse**

### ***II.5.5.1 Traitement intensif avec autogreffe***

Dans les protocoles IFM 99, les 112 patients (16%) ayant obtenu au moins une TBRP avant l'autogreffe n'avaient pas de bénéfice de survie par rapport à ceux obtenant la même réponse mais seulement après autogreffe (Harousseau et al, 2006). Dans l'étude de Lahuerta sur une cohorte de 632 patients traités par autogreffe (Lahuerta et al, 2008), la chronologie d'apparition de la RC pré ou post-autogreffe n'avait pas d'impact sur l'FS ou la survie. En revanche pour les patients en nRC après auto, la survie était meilleure lorsque la nRC avait été obtenue uniquement en post auto (augmentation de la réponse par l'autogreffe) par rapport aux patients en nRC avant auto et restant en nRC après auto (pas d'apport de l'autogreffe). Les données du protocole IFM 05-01 montrent un gain de réponse avant et après autogreffe dans le bras bortezomib-dexaméthasone qui se traduit par un gain de PFS (Harousseau et al, 2008).

Dans l'étude de San Miguel sur l'évaluation de la MRD (Paiva et al, 2008), 157 patients ont eu une évaluation de la MRD avant et après autogreffe. Les 16 patients n'ayant pas de MRD détectable dès la fin du traitement d'induction (avant autogreffe) avaient une PFS et une survie globale prolongée (PFS à 5 ans 80% et survie à 5 ans 100%) par rapport aux patients ayant une MRD présente avant autogreffe mais indétectable après (57% et 78%) et aux patients ayant une MRD détectable avant et après autogreffe (25% et 59%).

### ***II.5.5.2 Autres traitements***

La rapidité de la réponse a été démontrée par certains auteurs comme ayant un impact pronostique fort. Ainsi Shcaar a décrit une cohorte de 242 patients traités par MP par cycles de 4 semaines (Schaar et al, 2004). Un avantage de survie significatif était observé chez les patients qui avaient eu une diminution du taux du composant monoclonal de plus de 40% dès le premier cycle de MP. A l'opposé, dans l'étude de Blade, la rapidité de la réponse n'avait pas d'impact sur l'évolution des patients (Blade et al, 1994). Dans l'essai APEX (Richardson et al, 2007), la cinétique d'apparition de la meilleure réponse était variée. Soixante treize patients (54%) ont

atteint leur première réponse après le 2<sup>ème</sup> cycle, 39 patients (29%) après le 4<sup>ème</sup> cycle et 10 (7%) après le 6<sup>ème</sup> cycle. Par ailleurs, 76 patients (56%) ont amélioré leur réponse secondairement. Parmi les patients ayant obtenu une RC, 20% l'ont atteint pendant ou après le 8<sup>ème</sup> cycle. Dans l'étude VISTA (San Miguel et al, 2008), la vitesse d'apparition de la RC n'avait pas d'impact sur la survie.

Les études précédentes sont contradictoires car l'étude de Schaar incite à changer rapidement de traitement en l'absence de réponse significative rapide alors que les données de Blade et Richardson incitent à poursuivre un traitement bien toléré car la réponse, parfois très bonne, peut survenir secondairement. Ces résultats illustrent le fait qu'il est difficile de comparer l'effet de traitements différents et que les nouvelles drogues du myélome ont un effet différent des chimiothérapies conventionnelles.

## **II.5.6 Impact de la progression rapide après réponse initiale**

Dans un essai nordique chez 313 patients de moins de 60 ans traités par autogreffe (Lenhoff et al, 2006), la RC était associée à une EFS prolongée mais sans bénéfice de survie globale. En revanche, le délai de rechute était associé à la survie. Cent soixante deux patients ont rechuté après autogreffe. Les patients qui ont rechuté à 6 mois, à 6-12, à 12-24 ou à plus de 24 ans avaient une médiane de survie à respectivement 3, 17, 28, 37 mois.

Dans l'étude de Durie (Durie et al, 2004), le facteur ayant le plus fort impact pronostique en analyse multivariée était la survenue d'une progression rapide de la maladie à 6 mois ou 1 an. La survie des patients en progression était d'autant plus courte que les patients avaient eu une réponse initiale. Ainsi, la médiane de survie des patients ayant une progression de la maladie à 6 mois était de 4 à 5 mois chez les patients ayant eu initialement une réponse de plus de 50% et de 14 mois chez les patients initialement non répondeurs. Pour les patients sans progression à 6 mois, la médiane de survie était à 34 mois.

Ces deux études suggèrent que l'apparition rapide d'une rechute est un facteur de mauvais pronostic du myélome.

## II.5.7 Questions non résolues

L'impact de la réponse au traitement sur la survie a donc été démontré avec des traitements de première ligne ou de rechute, avec des chimiothérapies conventionnelles, des traitements intensifs avec autogreffe mais également avec les nouvelles drogues du myélome. Une des difficultés de toutes ces études est que les critères de réponse utilisés dans la littérature ne sont pas homogènes (EBMT, ECOG, SWOG,...), ce qui rend difficiles les comparaisons entre elles. Ainsi, dans de nombreuses études, la très bonne réponse partielle (TBRP) correspondant à une diminution de plus de 90% du pic n'était pas identifiée et donc pas évaluée. Le Groupe International d'étude du Myélome (IMWG) a proposé récemment une nouvelle définition des critères de réponse qui devrait être adopté pour tous les essais futurs, permettent une meilleure comparabilité entre les études (Durie et al, 2006).

- Chez les patients traités par autogreffe, les données de l'IFM et la méta-analyse de Van de Velde indiquent que la TBRP suffit alors que Lahuerta a démontré que la RC est préférable. Il reste également à définir le meilleur moment d'évaluation de la réponse puisque une autre étude de Lahuerta a démontré que, pour une même réponse finale, la survie peut être différente en fonction de la chronologie d'apparition de la réponse (Lahuerta et al, 2008).
- Chez les patients traités par chimiothérapie conventionnelle ou par les nouveaux traitements du myélome, la qualité de la réponse semble avoir un impact pronostique sur la survie mais des études complémentaires sont nécessaires avec les critères de l'IMWG prenant en compte la TBRP qui n'a pas été suffisamment évaluée.

Par ailleurs, plusieurs questions restent posées :

- Quelle est la meilleure évaluation de la qualité de la réponse chez les patients qui ont obtenu une disparition du pic sur l'électrophorèse des protides ? Le critère actuel est l'IF mais les données de San Miguel suggèrent que l'évaluation de la MRD en cytométrie est plus performante. Dans ce cadre, quel est l'impact de l'obtention d'une RC stricte (définie par une RC associée à une normalisation du taux de chaînes légères libres sériques) ?
- Avec l'utilisation des nouveaux traitements du myélome, l'objectif doit-il être d'obtenir une RC ? Ces traitements permettent d'envisager des traitements prolongés (traitement

d'entretien) dont l'objectif n'est plus d'obtenir une RC mais un contrôle prolongé de la maladie.

- Comment évaluer le bénéfice clinique de la réponse au traitement ? Avec l'augmentation de la survie, l'évaluation de l'impact clinique de la réponse au traitement ne peut plus se limiter à l'évaluation de la survie globale. La PFS paraît un bon critère de remplacement. De nouveaux critères ont été proposés comme le temps avant le traitement suivant (TNT pour Time to Next Therapy) ou le temps sans traitement (TFI pour Time Free Interval).

- Quelle stratégie adopter en cas de réponse modérée après 1 ou 2 cycles de traitements ? Les données des essais APEX et VISTA montrent que la réponse au bortezomib peut être retardée avec apparition secondaire de très bonne réponse. Dans ces conditions, sur quels critères se baser pour poursuivre ou stopper un traitement ?

## **II.6 Hétérogénéité du myélome**

L'évolution du myélome est très hétérogène. La médiane de survie est de 3-4 ans mais la survie des patients peut être de quelques mois à plus de 10 ans. De nombreuses études ont été menées pour identifier des facteurs pronostiques de la survie dans le myélome. Initialement, les marqueurs prédictifs étudiés étaient principalement liés aux complications de la maladie ou à la masse tumorale. L'amélioration récente des méthodes d'exploration du clone tumoral (cytométrie, cytogénétique, génomique,...) ouvre de nouvelles perspectives pour identifier des marqueurs prédictifs liés au clone tumoral en offrant la possibilité de prédire l'évolution des patients de manière plus performante et précise que les données biologiques habituelles.

Dès 1978, Matzner a identifié l'âge, le taux d'hémoglobine, la créatininémie, l'albuminémie, l'existence d'une hypergammaglobulinémie, l'isotype (IgA) comme des facteurs de mauvais pronostic (Matzner et al, 1978). Le tableau 3 résume les facteurs prédictifs de la survie identifiés en analyse univariée dans une cohorte de 1 027 myélomes traités à la Mayo Clinic entre 1985 et 1998 (Kyle et al, 2003). En analyse multivariée, les facteurs prédictifs de survie étaient l'âge, l'index de prolifération plasmocytaire, le taux de plaquettes, la créatininémie, l'albuminémie. Il est important de noter que dans cette étude rétrospective, les paramètres génétiques n'avaient pas été étudiés.

Prognostic factor	Median survival in presence vs absence of adverse prognostic factor (mo)	Overall survival	
		Relative risk (95% CI)	P value
Age ≥70 y	26 vs 41	1.5 (1.3-1.8)	<.001
Performance status 3 or 4	11 vs 36	1.9 (1.6-2.4)	<.001
Hemoglobin ≥10 g/dL	27 vs 38	1.3 (1.2-1.5)	<.001
Platelet count <150,000 × 10 <sup>9</sup> /L	24 vs 37	1.5 (1.2-1.8)	<.001
Serum calcium ≥11	23 vs 35	1.3 (1.1-1.6)	.006
Serum creatinine ≥2	21 vs 36	1.5 (1.3-1.8)	<.001
Serum albumin ≥3	18 vs 37	1.7 (1.4-2.0)	<.001
β <sub>2</sub> -Microglobulin >4 mg/L	28 vs 40	1.5 (1.3-1.8)	<.001
Plasma cell labeling index ≥1%	25 vs 40	1.5 (1.3-1.7)	<.001
Bone marrow plasma cell percentage ≥50%	31 vs 38	1.2 (1.0-1.4)	.01

\*CI = confidence interval.

**Tableau 3: Facteurs prédictifs de la survie dans une cohorte de 1 027 patients en analyse univariée (d'après (Kyle et al, 2003)).**

La recherche de facteurs prédictifs est importante pour 3 raisons (San Miguel et al, 2005) :

1. Fournir aux patients et à leur famille des informations individualisées sur le devenir.
2. Identifier des groupes de patients à risque pour adapter le traitement en fonction de l'évolution attendue et comparer les résultats de différentes stratégies thérapeutiques pour chacun des groupes identifiés.
3. Découvrir des liens entre des caractéristiques biologiques du clone tumoral et les manifestations cliniques pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie

### III. Facteurs pronostiques du myélome multiple

Nous ne détaillerons pas tous les facteurs pronostiques décrits dans la littérature (les principaux sont résumés dans le tableau 4). Beaucoup sont issus de cohorte unique et n'ont jamais été testés dans des cohortes indépendantes, ce qui limite leurs poids prédictifs. Schématiquement, les marqueurs prédictifs dans le myélome peuvent être classés en 3 catégories :

- les facteurs liés au patient (caractéristiques individuelles du patient)
- les facteurs résultant de l'interaction entre l'hôte et la tumeur (qui reflètent la masse tumorale et les complications de la maladie)
- les facteurs liés aux caractéristiques du clone tumoral (cytologie, cytométrie en flux, cytogénétique, génomique,...)

Les données obtenues par les études de génomique transcriptionnelle sont l'objet de cette thèse et seront exposées dans un chapitre indépendant. Cependant, la connaissance des facteurs pronostiques déjà décrits est indispensable car les études de génomiques ne peuvent se concevoir qu'en associant les données génétiques avec les données cliniques et biologiques des patients.

<b>Demographic and treatment-related factors</b>
Age $\geq$ 70 years <sup>1</sup>
Increasing number of chemotherapy regimens* <sup>2</sup>
Duration of standard-dose therapy > 12 months <sup>2</sup>
<b>Tumor-associated factors</b>
High plasma-cell proliferation rate (plasma-cell labeling index) <sup>1,4</sup>
Bone marrow plasma-cell infiltration $\geq$ 50%* <sup>1</sup>
Type of myeloma: IgA isotype <sup>3,5</sup>
Cytogenetic abnormalities, particularly abnormalities in chromosome 11 or 13, translocations, and hypodiploidy <sup>3,5,6</sup>
Increased microvessel density* <sup>7</sup>
<b>Abnormalities in laboratory measurements</b>
Thrombocytopenia ( $< 150\ 000 \times 10^9/L$ ) <sup>1,2,8,12</sup>
High serum creatinine <sup>1,2,12</sup>
Hypoalbuminemia <sup>4,9</sup>
Anemia (hemoglobin concentration $< 100\ g/L$ [ $10\ g/dL$ ]) <sup>10,12</sup>
High C-reactive protein concentration <sup>3</sup>
High serum $\beta_2$ -microglobulin concentration <sup>1-5,8,9,11</sup>
*Significant in univariate analysis only.

**Tableau 4 : Principaux facteurs pronostiques décrits (d'après (Richardson et al, 2005)).**

### III.1 Facteurs liés au patient

#### III.1.1 Age

Parmi les facteurs pronostiques liés au patient, l'âge semble être le plus important. L'âge a été décrit comme facteur pronostique indépendant dans de nombreuses études, quelque soit le traitement reçu. Sur une cohorte de 1 027 myélomes (Kyle et al, 2003), la médiane de survie des patients de plus de 70 ans était de 26 mois contre 41 mois pour les patients plus jeunes ( $p < 0,001$ ). Dans une cohorte de 414 patients de moins de 65 ans traités par autogreffe (Lenhoff et al, 2006), la médiane de survie après autogreffe était de 50 mois pour les patients âgés de 60 à 65 ans et de 66 mois pour les patients de moins de 60 ans ( $p < 0,001$ ) alors que le taux de réponse était le même dans les deux groupes de patients. Dans une cohorte de 425 patients âgés de plus de 65 ans et traités par chimiothérapie conventionnelle (Garcia-Sanz et al, 2004), la médiane de survie des patients de plus de 80 ans était de 9 mois et celle des patients âgés entre 65 et 80 ans était de 25 mois ( $p = 0,002$ ). Dans une étude plus récente, Ludwig a analysé les données de 10 549 patients dont 1 689 âgés de moins de 50 ans et 8 860 de plus de 50 ans (Ludwig et al, 2008). Au diagnostic, les patients de plus de 50 ans avaient plus de facteurs de mauvais pronostic. La survie des patients de plus de 50 ans était moins bonne (médiane 3,7 ans) que celle des patients plus jeunes (5,2 ans) (figure 5).

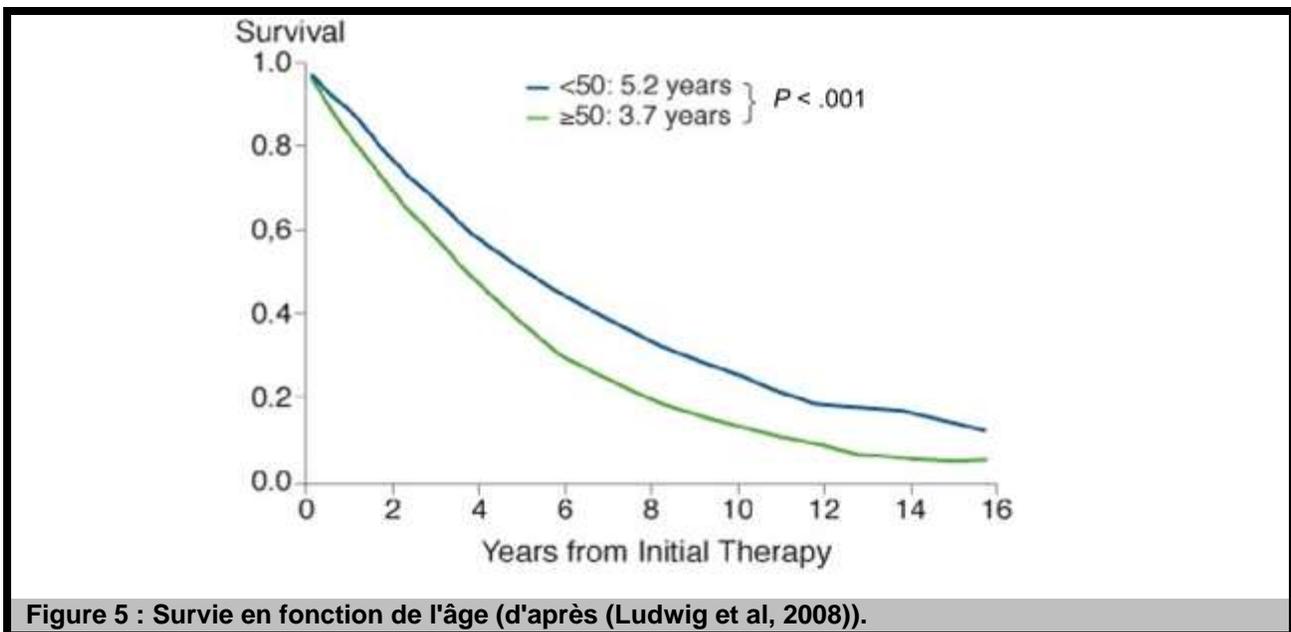


Figure 5 : Survie en fonction de l'âge (d'après (Ludwig et al, 2008)).

Par ailleurs, dans les 3 études récentes qui ont montré une augmentation de la survie des patients au cours des dernières années, le gain de survie ne concernait que les patients de moins de 65 ans (Kristinsson et al, 2007; Brenner et al, 2008; Kumar et al, 2008).

### **III.1.2 Etat général (performance status)**

L'état général des patients, évalué par le performance status (PS) a également été décrit comme facteur prédictif indépendant de la survie dans plusieurs études. En 1980, le MRC avait identifié le PS comme facteur pronostique indépendant sur une cohorte de 485 patients (MRC 1980). Il proposait une classification basée sur 3 critères : taux d'urée, taux d'hémoglobine, PS. Dans la cohorte de 1 027 myélomes de la Mayo Clinic, la médiane de survie des patients ayant un PS à 3-4 était plus courte que celle des patients ayant un PS plus faible (11 mois contre 36 mois) (Kyle et al, 2003).

### **III.1.3 Autres facteurs liés au patient**

D'autres facteurs liés au patient ont été étudiés mais n'ont pas le même impact que l'âge ou l'état général (San Miguel et al, 2005) : sexe, race, statut immunitaire,...

## **III.2 Facteurs résultant de l'interaction entre l'hôte et la tumeur**

Ces facteurs peuvent être liés aux complications du myélome, à l'activité de la maladie, à l'expansion du clone tumoral ou à la masse tumorale. La classification de Salmon et Durie proposée en 1975 avait pour objectif d'estimer la masse tumorale à partir de plusieurs marqueurs biologiques simples (Durie et al, 1975). Plus récemment, une étude rétrospective à grande échelle a permis de proposer une nouvelle classification du myélome, l'ISS (International Staging System) (Greipp et al, 2005).

### **III.2.1 Taux de beta2 microglobuline sérique**

Parmi les marqueurs biologiques associés à l'activité de la maladie, la beta2 microglobuline sérique ( $\beta$ 2m) est reconnue depuis près de 30 ans comme le marqueur pronostique individuel le

plus puissant. Dès 1980, Norfolk a décrit l'impact pronostique de la  $\beta 2m$  (Norfolk et al, 1980). Sur une cohorte de 37 patients, il avait observé que les patients ayant une  $\beta 2m$  inférieure à 4 mg/l à la première visite avaient une survie médiane de 46 mois contre 15 mois pour ceux dont la  $\beta 2m$  était  $> 4$  mg/l. Cet impact a été confirmé, depuis, sur de nombreuses études. Ainsi, sur une cohorte de 115 patients décrite par Bataille (Bataille et al, 1983), la  $\beta 2m$  était identifiée comme marqueur prédictif de survie en analyse multivariée. Les patients dont la  $\beta 2m$  initiale était  $> 6$  mg/l avaient une médiane de survie à 26 mois contre 52 mois pour ceux dont la  $\beta 2m$  était  $< 6$  mg/l. Dans une autre étude sur 160 patients, Bataille a confirmé l'impact pronostique du taux de  $\beta 2m$  au diagnostic pour prédire la survie (Bataille et al, 1984). Les patients ayant une  $\beta 2m < 2$  mg/l au moment de la réponse maximale avaient une durée de rémission plus longue que les autres patients. Depuis ces premiers résultats, l'impact pronostique du taux sérique de la  $\beta 2m$  ne s'est jamais démenti et la  $\beta 2m$  reste un marqueur prédictif incontournable qui garde un impact pronostique individuel, y compris dans les études de cytogénétiques ou de génomiques récentes (Avet-Loiseau et al, 2007). Plusieurs valeurs seuil ont été proposées en fonction des études, variant de 3 à 6 mg/l. Il est communément admis que la valeur pronostique de la  $\beta 2m$  est linéairement corrélée à son taux sérique.

L'interprétation d'une élévation du taux sérique de  $\beta 2m$  n'est pas univoque. La  $\beta 2m$  est liée à l'activité de la maladie, bien que le lien entre la physiopathologie du myélome et la  $\beta 2m$  ne soit pas encore établi. La  $\beta 2m$  est éliminée par voie rénale et son taux sérique est augmenté en cas d'insuffisance rénale, situation non exceptionnelle dans le MM. L'insuffisance rénale étant elle-même un facteur pronostique péjoratif dans le MM, le taux de  $\beta 2m$  est donc un facteur pronostique primordial. Si la mesure de la  $\beta 2m$  est indispensable au diagnostic chez tous patients ayant un myélome, son intérêt dans le suivi ou en rechute n'est pas établi.

### **III.2.2 CRP**

L'augmentation du taux de la CRP reflète l'action de l'IL-6, cytokine importante dans la prolifération et la survie des plasmocytes. Un taux élevé de CRP a été corrélé à une survie significativement plus courte. Ceci a été démontré par Bataille sur une cohorte de 162 patients au diagnostic (Bataille et al, 1992). Le taux de CRP était prédictif et indépendant de la  $\beta 2m$ . En combinant ces deux facteurs (valeur seuil à 6 mg/l pour les deux facteurs), les auteurs définissaient 3 groupes avec une médiane de survie estimée respectivement à 54, 27 et 6 mois

( $p < 0,0001$ ). La CRP est cependant modifiée dans d'autres situations comme les infections, ce qui rend son interprétation en pratique difficile.

### **III.2.3 Albuminémie**

Le taux sérique d'albumine est également corrélé à la survie. Des taux très bas d'albumine (en pratique inférieure à 30mg/L) sont corrélés à une survie plus courte des MM (Bataille et al, 1986). Ce facteur biologique décrit comme prédictif de la survie dans plusieurs études (Kyle et al, 2003) est l'un des deux critères pris en compte dans l'ISS (Greipp et al, 2005).

### **III.2.4 Autres facteurs prédictifs**

De nombreux autres facteurs prédictifs ont été décrits. On retiendra notamment : l'isotype (IgA de moins bon pronostic), le taux du composant monoclonal, la plasmocytose médullaire, le taux de chaînes légères libre sérique, l'existence d'une anémie, d'une insuffisance rénale, d'une hypercalcémie, d'une thrombopénie,...) (Richardson et al, 2005).

### **III.2.5 Classification de Salmon et Durie**

L'importance de la masse tumorale a été l'un des premiers facteurs pronostiques identifiés. Cependant son estimation était difficile. La classification de Salmon et Durie a été développée il y a plus de 30 ans pour permettre l'estimation de la masse tumorale en routine (Durie et al, 1975). Connaissant la production d'immunoglobulines d'un plasmocyte et la demi-vie des immunoglobulines circulantes, il était possible d'estimer mathématiquement le nombre total de cellules malignes et la masse tumorale. La masse tumorale ainsi estimée a été corrélée avec les données individuelles biologiques et radiologiques de 71 patients. Les analyses multivariées ont montré que la masse tumorale pouvait être estimée en tenant compte de la concentration du composant monoclonal sanguin ou urinaire, du taux d'hémoglobine, de la calcémie, de l'existence et de l'extension des lésions osseuses. A partir de ces résultats, une classification pour le classement des myélomes a été proposée. Depuis, la classification de Salmon et Durie est largement utilisée. Cependant, l'évaluation de l'atteinte osseuse, qui est un critère important, est difficile, examinateur dépendant, ce qui pose problème pour son utilisation au quotidien. Par

ailleurs, cette classification ne prend pas en compte les critères liés au clone plasmocytaire dont l'impact pronostique est très important.

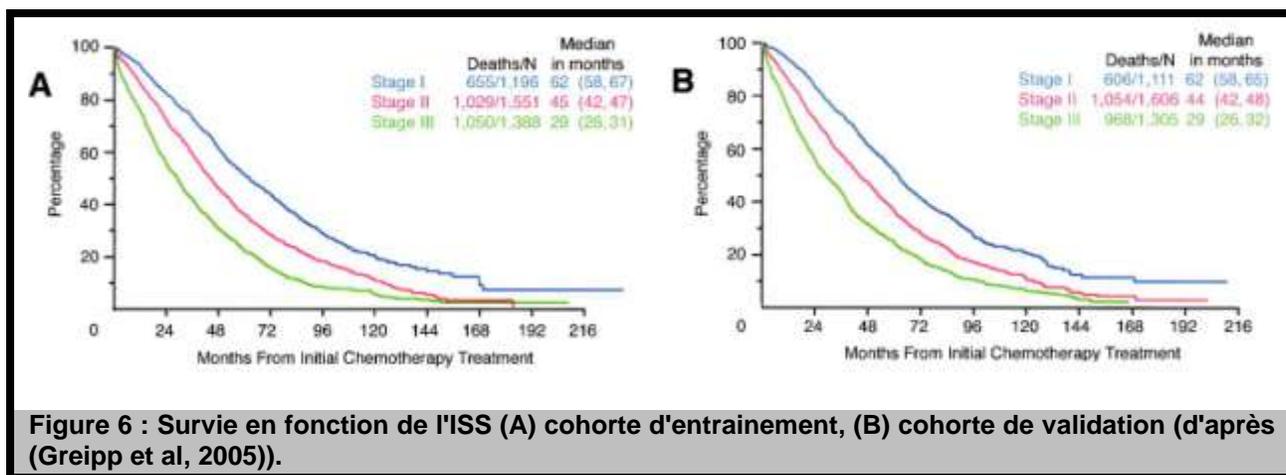
Depuis la description de la classification de Salmon et Durie, d'autres classifications ont été proposées. Dans une étude de Merlini portant sur 173 patients (Merlini et al, 1980), les facteurs prédictifs de survie des myélomes IgG ou à chaînes légères étaient la créatininémie, la calcémie, la plasmocytose médullaire. Pour les myélomes à IgA, les facteurs retenus étaient le taux d'hémoglobine, la calcémie et le taux du composant monoclonal. A partir de ces résultats les auteurs ont proposé un score permettant de classer les patients en fonction de leur risque évolutif. A partir de l'analyse d'une cohorte de 485 patients, le Medical Research Council (MRC) a également proposé une classification basée sur 3 facteurs prédictifs (MRC 1980) : le taux d'urée, le taux d'hémoglobine et le performans status. Les 3 groupes définis représentaient 22%, 56% et 22% des patients et la survie à 2 ans était respectivement 76%, 50% et 9%. En 1986, Bataille a étudié, sur une cohorte de 147 patients, l'impact pronostique sur la survie des classifications de Salmon et Durie, de Merlini et du MRC en tenant compte de l'ensemble des données biologiques des patients (Bataille et al, 1986). Cette étude a confirmé l'impact sur la survie des 3 scores avec un avantage pour la classification de Salmon et Durie. Cependant, parmi les variables biologiques des patients, le taux de  $\beta_2m$  était le facteur prédictif le plus puissant ( $p < 0,0001$ ) et le taux d'albumine était le seul critère dont l'apport était significatif ( $p = 0,02$ ). Le taux de  $\beta_2m$  était un meilleur facteur prédictif que le score de Merlini ou du MRC et la combinaison  $\beta_2m$ /albuminémie était un meilleur marqueur de survie que la classification de Salmon et Durie.

### **III.2.6 International Staging System (ISS)**

La majorité des études publiées étaient de petite taille et ne permettaient pas une généralisation de leurs résultats. Il était nécessaire d'essayer d'établir un score pronostique universel dans le myélome multiple. Dans d'autres hémopathies, des approches basées sur l'étude d'un grand nombre de patients avaient permis d'établir des scores pronostiques qui sont actuellement universellement utilisés. C'est ainsi qu'a été défini l'IPI (Index Pronostic International) dans les LNH (1993). C'est par analogie avec cette approche qu'une analyse rétrospective sur 10 750 patients a été menée en 2005 (Greipp et al, 2005). Les patients avaient été pris en charge entre 1981 et 2002 dans différents pays en Asie, Europe ou Amérique du Nord. L'âge médian des

patients était de 60 ans. La majorité des patients (7 942 patients) avaient reçu une chimiothérapie standard et 2 808 patients avaient reçu un traitement intensif avec autogreffe. Une analyse initiale a été menée sur 5 383 patients constituant une « cohorte d'entraînement ». En analyse multivariée, les facteurs prédictifs identifiés étaient : un taux de  $\beta$ 2m élevé (valeur seuil 3,5 mg/l), une thrombopénie ( $130\,000/\text{mm}^3$ ), une élévation de la créatinine (2 mg/dl), une hypoalbuminémie (35 g/l) et une hypocalcémie (10 mg/dl). Avec plusieurs approches statistiques différentes, les deux marqueurs les plus performants étaient la  $\beta$ 2m et le taux d'albumine. En combinant ces deux facteurs, les auteurs ont défini un score baptisé ISS (pour International Staging System) permettant de classer les patients en 3 groupes de pronostic distinct. La répartition des patients au sein des 3 groupes ISS I, II et III était respectivement 28,9%, 37,5% et 33,6%. La survie de ces 3 groupes était très différente avec une médiane de survie estimée pour chacun des groupes, à respectivement, 62, 45 et 29 mois ( $p=0,0001$ ) (figure 6A). Ce score a été validé sur la deuxième partie de la cohorte avec une répartition identique des patients et une corrélation à la survie (figure 6B).

L'ISS était validé quelque soit la zone géographique, le type de prise en charge (institution ou groupe coopératif), le type de traitement (chimiothérapie standard ou traitement intensif), l'âge des patients (valeur seuil 65 ans).



L'ISS est un score intéressant car simple, utilisable dans toutes les structures et validé dans plusieurs zones géographiques avec traitement intensif ou chimiothérapie conventionnelle. Il permet une classification homogène de tous les patients permettant une comparaison fiable des

essais thérapeutiques. Il est plus reproductible que la classification de Salmon et Durie. Cependant, les limites de l'ISS sont nombreuses (Kyle et al, 2009) :

- Il ne peut être utilisé pour le diagnostic différentiel entre MGUS SMM et myélome.
- Il ne peut être utilisé qu'une fois le diagnostic de MM posé.
- Le groupe ISS III est un groupe composite comprenant des patients dont la  $\beta$ 2m est augmentée en lien avec l'activité de la maladie et des patients dont la  $\beta$ 2m est augmenté en lien avec une insuffisance rénale. L'ISS n'est donc pas un bon marqueur de la masse tumorale et ne peut pas être utilisé pour la stratification thérapeutique.
- L'ISS est validé pour les chimiothérapies conventionnelles et les traitements intensifs (avec autogreffe) mais son impact doit être évalué avec les nouvelles traitements.
- Par ailleurs, il ne prend pas en compte les caractéristiques du clone tumoral. Les données des études génétiques montrent bien que l'impact pronostique de l'ISS est dépassé par les marqueurs génétiques.

Il est intéressant de constater que l'analyse d'une grande cohorte de patients confirme les résultats publiés par Bataille en 1986 sur une petite cohorte de patients (Bataille et al, 1986). Cela prouve l'impact important de ces deux marqueurs et spécifiquement de la  $\beta$ 2m. La  $\beta$ 2m reste un des facteurs prédictifs les plus performants depuis sa description en 1980 par Norfolk (Norfolk et al, 1980). Cependant, à ce jour, son lien physiopathologique avec le pronostic de la maladie reste mystérieux.

### **III.2.7 Comparaison de la classification de Salmon et Durie et de l'ISS**

Une étude publiée en mars 2009 a comparé la classification de Salmon et Durie avec l'ISS sur une cohorte multicentrique de 729 patients pris en charge entre 1995 et 2000 avec traitement par autogreffe (Hari et al, 2009). La durée médiane de suivi était de 56 mois. La concordance entre les deux classifications n'était que de 36% (tableau 5).

		ISS			
		I	II	III	
DSS	I	26 (4%)	20 (3%)	4 (1%)	50 (7%)
	II	92 (13%)	104 (14%)	34 (5%)	230 (32%)
	III	134 (18%)	183 (25%)	132 (18%)	449 (62%)
		252 (35%)	307 (42%)	170 (23%)	36%

**Tableau 5 : Comparaison de la classification de Salmon et Durie (DSS) avec l'ISS dans une cohorte de 729 patients (d'après (Hari et al, 2009)).**

Le score de Brier (analyse qui évalue les performances prédictives) trouvait que la classification de Salmon et Durie était un meilleur prédicteur. Cependant, les deux classifications avaient des performances prédictives faibles soulignant l'importance d'y ajouter d'autres marqueurs génétiques ou imagerie fonctionnelle.

### **III.3 Facteurs pronostiques liés au clone tumoral**

Les caractéristiques intrinsèques du clone tumoral ont un impact important sur l'évolution de la maladie. Pour des raisons techniques, ces paramètres étaient peu pris en compte initialement. Avec le développement des études phénotypiques et génétiques, la caractérisation du clone tumoral est meilleure. Les études de cytométrie, de cytogénétique et plus récemment de génomique ont permis, dans un premier temps, de décrire l'hétérogénéité des plasmocytes malins et, dans un second temps, de corrélérer cette hétérogénéité avec les données cliniques pour identifier des facteurs pronostiques. Cependant, pour le moment, l'impact de ces facteurs sur la prise en charge des patients au quotidien reste faible car les techniques utilisées ne sont pas disponibles dans tous les laboratoires.

### **III.3.1 Capacité de prolifération**

Le paramètre le plus anciennement connu concerne les capacités prolifératives des plasmocytes malins. En effet, le statut prolifératif des plasmocytes malins, qu'il soit évalué sur la phase S ou sur l'index d'ADN après incorporation de BrdU, est inversement corrélé avec la survie des patients (Greipp et al, 1993; San Miguel et al, 1995; Garcia-Sanz et al, 2004). Cependant, ce paramètre reste difficile d'utilisation du fait de la nécessité d'analyse immédiate après le prélèvement car les capacités prolifératives plasmocytaires diminuent rapidement ex vivo. Il peut maintenant être estimé par d'autres techniques notamment génétiques avec l'étude de l'expression des gènes de prolifération (Bergsagel et al, 2005).

### **III.3.2 Cytologie**

La cytologie n'est pas très discriminante dans l'étude du myélome. La forme cytologique du plasmocyte malin est proche de celle d'un plasmocyte normal. Il n'existe pas de morphologie particulière du plasmocyte malin qui pourrait le distinguer d'un plasmocyte normal. Parfois, le plasmocyte malin peut présenter des caractères d'immatunités : présence d'un nucléole dans le noyau et une taille plus grande. Une classification des MM en fonction de la morphologie a été établie par Greipp (Greipp et al, 1985) en fonction de la proportion de plasmocytes matures, immatures, plasmablastiques sur une cohorte de 100 patients ayant un myélome au diagnostic. Ainsi, la forme dite mature représente 28%, la forme intermédiaire 38%, immature 19%, ou plasmablastique (au moins 2% de plasmablastes) 15%. La survie des patients ayant un phénotype plasmablastique était plus faible que les autres groupes de patients. La médiane de survie de ce groupe était estimée à 10 mois contre une survie médiane cumulée de 35 mois pour les autres groupes. L'impact de ce critère morphologique a, depuis, été confirmé sur des cohortes de patients traités en première ligne ou en rechute (Greipp et al, 1998).

Greipp (Greipp et al, 1998) a étudié 453 patients au diagnostic de myélome. L'aspect des plasmocytes était étudié par deux examinateurs indépendants avec une concordance de 85%. Un phénotype plasmablastique a été observé chez 37 patients (8,2%). Le phénotype plasmablastique était associé à une fréquence accrue des complications du myélome, à un index de prolifération plasmocyttaire plus élevé, à une EFS plus courte (EFS médiane 1,1 an contre 2,7 ans) et à une

diminution de la survie (survie médiane 1,9 ans contre 3,7 ans). Par ailleurs, le phénotype plasmablastique était un facteur pronostique indépendant de la PFS et de la survie en analyse multivariée.

Dans une série de 75 patients avec myélome en rechute ou réfractaire traités par autogreffe, 19 patients (28%) avaient un phénotype plasmablastique (Rajkumar et al, 1999). La PFS après autogreffe était plus courte dans le groupe avec phénotype plasmablastique (PFS médiane 4 contre 12 mois  $p < 0,001$ ) ainsi que la survie globale (5 mois contre 24 mois  $p < 0,001$ ). Les auteurs proposaient un score basé sur le phénotype plasmablastique, l'index de prolifération plasmocytaire, les LDH et la cytogénétique. Trois groupes étaient ainsi définis en fonction du nombre de facteurs de mauvais pronostic présents (0, 1 ou 2 et plus) avec une survie très différente (médiane de survie 38 mois, 17 mois, 8 mois).

La difficulté des analyses cytologiques est qu'elles dépendent de l'examineur et qu'elles nécessitent des critères stricts et reproductibles.

### **III.3.3 Phénotype**

Les analyses en cytométrie sont de plus en plus fréquemment utilisées dans l'évaluation pronostique des hémopathies malignes. Dans le myélome, les analyses en cytométrie sont réservées à la recherche ou à des cas atypiques qui nécessitent une expertise phénotypique. Les analyses phénotypiques réalisées depuis plusieurs années ont démontré l'hétérogénéité phénotypique des plasmocytes de myélome (San Miguel et al, 2002; Robillard et al, 2005). Si la morphologie ne permet pas la distinction entre le plasmocyte normal et malin, il existe des variations marquées sur le plan phénotypique qui permettent cette distinction. Tous les plasmocytes expriment à leur surface le CD38 et le CD138 (syndecan 1). Seuls les plasmocytes observés en cas de plasmocytose réactionnelle ont une expression faible voire nulle du CD138 (Jego et al, 1999). La double expression du CD38 et du CD138 permet ainsi d'affirmer la nature plasmocytaire d'une cellule médullaire sans pour autant préjuger de son caractère malin (Ocqueteau et al, 1998).

En situation physiologique, les plasmocytes médullaires ne représentent que 0,14-0,3% des cellules mononuclées. Ocqueteau a étudié, de façon comparative, le phénotype des plasmocytes

médullaires de 76 MGUS, 65 MM et 10 sujets sains (Ocqueteau et al, 1998). Les plasmocytes normaux expriment à leur surface les molécules CD138, CD38, CD19 mais sont majoritairement négatifs pour le CD56. Les plasmocytes malins de myélome expriment le CD138 et le CD38, mais sont majoritairement négatifs pour le CD19 et positifs pour le CD56. En 1994, Pellat-Deceunynck a montré que les plasmocytes normaux expriment le CD19, le CD40 et sont négatifs pour le CD56 et le CD28 (Pellat-Deceunynck et al, 1994). L'augmentation de l'expression du CD56 est associée au MM et le CD28 est exprimé dans les formes accélérées de la maladie. Pour San Miguel, les plasmocytes sont normaux lorsqu'ils expriment fortement le CD138, le CD45 et n'expriment pas le CD56, le CD20, le CD28, le CD33 et le CD117 (San Miguel et al, 2002).

### ***III.3.3.1 Description de l'hétérogénéité***

Le plasmocyte malin a un profil phénotypique hétérogène d'un patient à l'autre et au sein même de la population tumorale d'un patient. Garcia-Sanz (Garcia-Sanz et al, 1999) a montré que plus de 70% des plasmocytes prélevés chez des patients expriment le CD56, 30 à 70% sont positifs pour le CD13, le CD117 et le DR et seulement 17% pour le CD20. Moins de 10% des patients expriment le CD15 et le CD10. Les formes leucémisées n'expriment pas le CD117 et des expressions variables du DR et du CD56. Robillard a rapporté aussi une expression variable du CD19, du CD20, du CD27, du CD56 et du CD11a dans les plasmocytes tumoraux (Robillard et al, 2005). L'expression du CD45 est également variable et Bataille a proposé une classification phénotypique basée sur l'expression du CD45 (Bataille et al, 2003). Les plasmocytes CD45+ ont un indice de prolifération élevé et dépendent de l'IL-6 pour la survie. A l'inverse, les plasmocytes CD45- ont un indice de prolifération faible et sont indépendants vis-à-vis de l'IL-6 pour leur survie. Au cours de l'évolution de la maladie, la perte de l'expression du CD45 traduit un stade avancé moins dépendant vis-à-vis de l'IL-6.

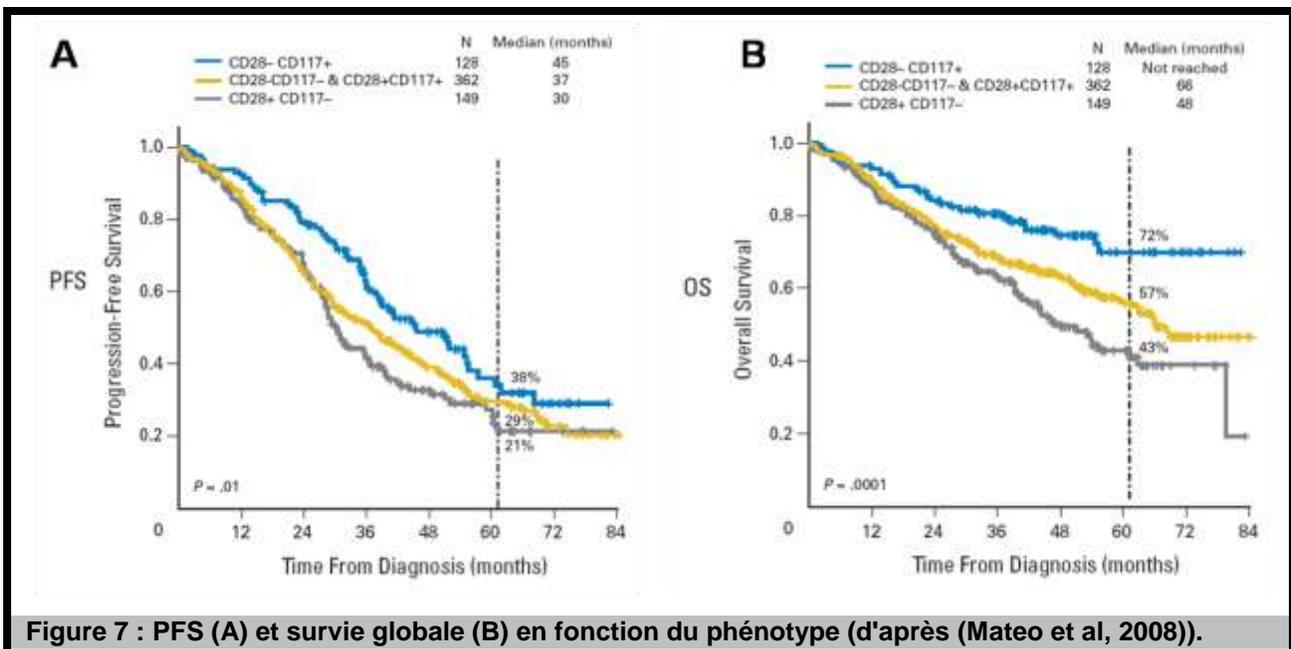
### ***III.3.3.2 Corrélation phénotype et pronostic***

Beaucoup de résultats contradictoires ont été rapportés. Les différences entre les études étaient liées au fait que les études étaient de petite taille avec des traitements non homogènes et que la technique de cytométrie n'était pas standardisée (multi couleurs, nature des anticorps et critères de positivité). Une standardisation des méthodes a été récemment proposée par un consensus européen (Rawstron et al, 2008).

Une étude publiée récemment par l'équipe de San Miguel a démontré l'intérêt de l'analyse phénotypique pour l'évaluation pronostique dans le myélome (Mateo et al, 2008). Les auteurs ont analysé prospectivement un grand nombre de marqueurs phénotypiques chez 685 nouveaux myélomes traités de manière homogène selon un protocole espagnole GEM/PETHEMA 2000 (traitement d'induction puis autogreffe). Les analyses cytométriques étaient réalisées au diagnostic. La première constatation était que le profil antigénique des plasmocytes de myélome était très varié. Les auteurs ont étudié l'impact des marqueurs phénotypiques sur la survie sans progression (PFS) et la survie globale. L'expression du CD19 ou du CD28 ainsi que l'absence d'expression du CD117 étaient associées à une PFS et à une survie globale plus courtes. En combinant l'expression du CD28 et du CD117, les auteurs ont défini 3 groupes de patients

- Un groupe de mauvais pronostic (149 patients 23%): CD28+ et CD117-
- Un groupe de pronostic intermédiaire (362 patients 56%): CD28 - et CD117-  
ou  
CD28+ et CD117+
- Un groupe de bon pronostic (128 patients 21%) : CD28- et CD117+

La médiane de PFS dans ces trois groupes était respectivement de 30, 37 et 45 mois et la médiane de survie était respectivement de 48 mois, 66 mois et non atteinte (avec un suivi médian de 48 mois) (figure 7).



Le phénotype était associé à certaines caractéristiques de la maladie et notamment à l'existence d'anomalies cytogénétiques. Ainsi, l'expression du CD28 était corrélée à un score ISS plus élevé, un taux de plasmocytes en phase S plus haut et à l'absence d'hyperdiploïdie. Le CD28 était corrélé à une plus grande fréquence de translocation t(4;14) et de délétion du chromosome 17p. L'absence de CD117 était également associée à des critères de mauvais pronostic (infiltration plasmocytaire médullaire, anémie, insuffisance rénale, élévation de la  $\beta$ 2m, ISS haut, absence d'hyperdiploïdie) et à une plus grande fréquence des t(4;14), t(11;14) et de la délétion du chromosome 13. Parmi les patients ayant des critères cytogénétiques de mauvais pronostic (t(4;14), t(14;16) et del 17), seuls 7% étaient classés dans le groupe phénotypique de bon pronostic et 25% dans le groupe phénotypique de mauvais pronostic. La classification phénotypique proposée était indépendante de l'ISS. Chez les patients ayant un ISS à 3, le phénotype CD28+ CD117- identifiait un sous groupe de patients ayant une survie plus courte (survie à 3 ans 40%) que les patients ayant un phénotype CD28- CD117+ (survie à 3 ans 58%).

En analyse multivariée sur l'ensemble des patients, le phénotype CD28+ CD117- était un facteur indépendant prédictif de la PFS mais pas de la survie globale. Par ailleurs, en ne tenant compte que des 231 patients ayant bénéficié d'une analyse cytogénétique, le phénotype CD28+ CD117- n'était plus identifié comme facteur prédictif indépendant contrairement à la t(4 ;14) et à la del17 qui gardaient leur impact pronostic.

Cette étude est la première à démontrer l'impact pronostic de l'analyse phénotypique des plasmocytes malins. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats et étudier le poids du phénotype par rapport aux anomalies cytogénétiques. Le phénotype CD28+ CD117 – est-il corrélé aux anomalies cytogénétiques ou est-il un marqueur pronostic indépendant ?

### III.3.4 Cytogénétique – analyse en FISH

L'étude cytogénétique des plasmocytes dans le myélome a longtemps été difficile compte tenu du faible infiltrat médullaire et du faible index de prolifération des plasmocytes malins. La cytogénétique standard identifiait des anomalies chromosomiques quantitatives chez environ 30

% des myélomes. Le développement des techniques d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur cellules interphasiques a rendu possible l'analyse de cellules plasmocytaires non proliférantes. La FISH interphasique est à ce titre l'outil idéal, à la condition expresse qu'elle soit couplée à une reconnaissance obligatoire des plasmocytes (par immuno-fluorescence associée ou par tri plasmocytaire). Moyennant ces contraintes techniques incontournables, toutes les informations génétiques nécessaires à la définition du pronostic peuvent être obtenues.

Le myélome est caractérisé par une instabilité génétique qui augmente avec la progression de la maladie. Les événements initiaux incluent des translocations impliquant le gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines (locus 14q32) avec certains partenaires récurrents ou une hyperdiploïdie. Cette phase initiale est ensuite suivie d'une instabilité complémentaire pendant la progression de la maladie qui inclut notamment des délétions ou des monosomies du chromosome 13, des activations d'oncogène, des translocations secondaires (telles que la translocation impliquant c-myc). Des amplifications ou des délétions de chromosome sont fréquentes et notamment l'amplification du bras long du chromosome 1 (gains de 1q) et la délétion du bras court du chromosome 17 (del17).

### ***III.3.4.1 Description de l'hétérogénéité***

Des anomalies chromosomiques quantitatives et structurales ont été identifiées dans plus de 90 % des myélomes et dans environ 50 % des cas de MGUS (Avet-Loiseau et al, 1998; Avet-Loiseau et al, 2000; Fonseca et al, 2002; Fonseca et al, 2004; Magrangeas et al, 2005). Ces études ont permis de dresser un «catalogue» assez précis des anomalies chromosomiques les plus fréquemment rencontrées.

#### *III.3.4.1.1 Translocation impliquant la région 14q32*

L'anomalie la plus fréquente est sans doute représentée par les translocations impliquant la région 14q32 (t(14q32)) et, en particulier, le gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IGH). Ces anomalies se retrouvent chez environ 60 % des patients (Avet-Loiseau et al, 2002; Fonseca et al, 2003). Contrairement aux lymphomes malins (dans lesquels le partenaire de la translocation est spécifique du type histologique), les partenaires chromosomiques sont extrêmement variés dans le MM. A ce jour, plus de 30 régions chromosomiques ont été rapportées. Néanmoins, seules certaines d'entre elles paraissent réellement récurrentes. Par ordre de fréquence décroissante, on

retrouve la t(11;14)(q13;q32) (environ 20 % des patients), la t(4;14)(p16;q32) (~15 %), la t(14;16)(q32;q23) (~5 %), la t(6;14)(p21;q32) (<2 %) et la t(14;20)(q32;q11) (<3 %). Les autres cas (~15-20 % des patients) semblent correspondre à des cas uniques, laissant suspecter l'origine aléatoire de ces réarrangements non récurrents.

Ces translocations entraînent la dérégulation de gènes spécifiques (tableau 6). Ainsi, la t(11;14) dérégule le gène *CCND1*, conduisant à une hyperexpression de la cycline D1, en tout point superposable à celle observée dans le lymphome du manteau (dans lequel la translocation est constante) (Chesi et al, 1996). La t(4;14) est unique, dans le sens où elle n'a jamais été décrite dans d'autres pathologies (mais elle n'est pas identifiable par cytogénétique conventionnelle), et où elle entraîne la dérégulation de 2 gènes situés de part et d'autre du point de cassure sur le chromosome 4 (Chesi et al, 1997). Le gène *FGFR3*, situé en position distale (télomérique), est transloqué sur le dérivé du chromosome 14, conduisant à sa surexpression. En position proximale par rapport au point de cassure, un gène a été identifié par clonage de la translocation : le gène *MMSET*. Ce gène (dont les fonctions restent essentiellement méconnues) comporte un domaine SET, qui serait impliqué dans la régulation de la conformation chromatinienne. La translocation conduit à la formation d'un gène chimérique sur le dérivé du chromosome 4, ce qui constitue un cas d'espèce dans les translocations 14q32. La t(14;16) dérégule l'oncogène *MAF* en le déplaçant sur le der(14) (Chesi et al, 1998). La t(6;14) et la t(14;20) conduisent à une hyperexpression des gènes *CCND3* (codant pour la cycline D3) (Shaughnessy et al, 2001) et *MAFB* (Hanamura et al, 2001), respectivement. Cette disparité de partenaires chromosomiques explique sans doute en partie l'hétérogénéité de la pathologie (Magrangeas et al, 2005). Ces anomalies chromosomiques impliquant le gène *IGH* sont très certainement très précoces dans l'oncogenèse de la maladie. En effet, lorsque l'on analyse des cas de MGUS, l'incidence de ces réarrangements illégitimes est globalement la même que dans le MM symptomatique, avec peut-être une moindre incidence de t(4;14) (Avet-Loiseau et al, 1999; Fonseca et al, 2002).

Chromosomal translocation	Gene dysregulated by translocation
t(11;14)	<i>CCND1</i> (cyclin D1)
t(4;14)	<i>FGFR-3</i> and <i>MMSET</i>
t(6;14)	<i>CCND3</i> (cyclin D3)
t(14;16)	<i>C-MAF</i>
t(14;20)	<i>MAF-B</i>

**Tableau 6 : Translocations récurrentes et gènes dérégulés par ces translocations (d'après (Avet-Loiseau et al, 2007)).**

#### *III.3.4.1.2 Hyperdiploïdie*

La seconde anomalie en terme de fréquence est l'hyperdiploïdie (50 à 60 % des patients) (Lai et al, 1995; Smadja et al, 2001). Sans être à proprement parler une anomalie chromosomique en soi, l'hyperdiploïdie est reconnue comme telle par ses caractéristiques. En effet, la nature des chromosomes en excès n'est pas aléatoire et touche tout particulièrement les chromosomes impairs (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 et 21). Aucune explication (ni même hypothèse) n'a été avancée à ce jour pour expliquer ce biais dans la nature des chromosomes gagnés. Ceci est d'autant plus troublant que, si l'on analyse la nature des chromosomes impliqués dans les hyperdiploïdies d'une autre hémopathie B, la leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant, ceux-ci sont totalement différents. Quoiqu'il en soit, l'hyperdiploïdie dans le MM représente très probablement une voie oncogénique distincte de celle liée aux t(14q32). En effet, les réarrangements récurrents impliquant la région 14q32 sont pratiquement incompatibles avec une hyperdiploïdie (Fonseca et al, 2003). De plus, tout comme les t(14q32), l'hyperdiploïdie a été démontrée dans les MGUS, montrant ainsi le caractère précoce de survenue de ces anomalies (Zandecki et al, 1997).

#### *III.3.4.1.3 Délétion du bras long du chromosome 13*

La troisième anomalie est la perte de matériel chromosomique sur le chromosome 13. Cette anomalie a été l'une des premières à être reconnue dans les études cytogénétiques. Initialement décrite comme des pertes centrées sur la région 13q14, il a été montré par la suite que la très grande majorité de ces anomalies correspondait en fait à des monosomies 13 (Avet-Louseau et al, 2000; Fonseca et al, 2001). Il n'est d'ailleurs pas certain que les rares délétions partielles (<10 % des anomalies du 13) aient la même traduction biologique que les pertes complètes. Tout comme les précédentes anomalies, les anomalies du 13 ont été décrites dans les MGUS, avec une incidence similaire à celle retrouvée dans le MM, soit de l'ordre de 40-50 % (Avet-Loiseau et al, 1999; Fonseca et al, 2002). La distribution de ces anomalies ne semble pas aléatoire. Alors qu'elles sont rarement retrouvées chez les patients hyperdiploïdes, elles sont à l'inverse pratiquement constantes chez les patients présentant une t(4;14), une t(14;16) ou une del(17p). Là encore, aucune hypothèse n'est avancée pour expliquer ce biais de répartition. Tout comme les 2 précédentes anomalies, les anomalies du chromosome 13 sont très probablement primitives ou, tout du moins, surviennent lors des premiers stades de l'oncogenèse plasmocytaire.

#### *III.3.4.1.4 Gains de copies du bras long du chromosome 1*

La quatrième anomalie, par ordre de fréquence est représentée par les gains de copies supplémentaires du bras long du chromosome 1 (ou gains de 1q). Cette anomalie n'est pas spécifique au myélome. Elle a été décrite dans de très nombreuses hémopathies malignes, mais également dans de nombreux types de tumeurs solides. Récemment, l'équipe de Little Rock a rapporté des données d'analyse de profils d'expression génique, montrant une très forte corrélation entre des gains de 1q et l'hyperexpression d'un gène dénommé CKS1B (Shaughnessy et al, 2005). Par analyse FISH, ils ont montré que tous les cas d'hyperexpression de ce gène étaient associés à la présence de 1 à 4 copies supplémentaires de ce gène. Ces données ont été confirmées dans une série de l'IFM. Le rôle biologique de cette anomalie n'est pas connu, tout au plus peut-on supposer un rôle de cette protéine dans la régulation positive du cycle cellulaire. Cette anomalie ne paraît pas primitive puisque non retrouvée dans les MGUS, et à l'inverse, très fréquente en rechute. Cependant, la preuve formelle de l'implication de ce gène dans l'oncogenèse du myélome n'a pas été apportée à ce jour. D'autres oncogènes comme BCL9 font partie de l'amplicon et représentent de bons candidats potentiels comme cibles de ces anomalies.

#### *III.3.4.1.5 Délétion du bras court du chromosome 17*

La dernière anomalie récurrente, sans doute importante au plan biologique dans le myélome, est la perte du bras court du chromosome 17 (del(17p)). Les études se sont concentrées sur le gène de la P53, situé en 17p13. Par analyse FISH, la plupart des études montrent une perte de ce gène chez près de 10 % des patients atteints de MM, mais exceptionnellement dans les cas de MGUS (Drach et al, 1998; Avet-Loiseau et al, 1999). La cible principale de ces délétions n'est pas connue à ce jour. En effet, toutes les études se sont focalisées de manière arbitraire sur le gène de la P53, sans aucun rationnel scientifique. En effet, ce gène est très rarement muté au diagnostic dans le MM, et même en phase terminale, le taux de mutation est faible (Preudhomme et al, 1992). De même, la perte d'un allèle de ce gène nécessiterait une mutation du second allèle pour avoir une implication biologique. Tout ceci plaide plutôt pour une cible autre que la P53, qui reste toutefois à découvrir.

### III.3.4.1.6 Translocations secondaires

Parmi les translocations secondaires, les plus fréquentes sont celles qui impliquent le locus du gène c-myc (Avet-Loiseau et al, 2001). Les mécanismes de ces translocations sont multiples (t(8;14), t(8;22), autres partenaires,...). Dans une cohorte de 610 patients atteints de myélome ou de leucémie à plasmocytes, une translocation c-myc était mise en évidence chez 15% des patients. Ces données ont été confirmées sur une plus large cohorte de 1 086 patients de l'IFM avec une fréquence des translocations c-myc mise en évidence chez 74 patients sur les 571 testés (13%) (Avet-Loiseau et al, 2007).

### III.3.4.2 Implications pronostiques

La principale conséquence pratique de la recherche de ces anomalies chromosomiques est l'implication pronostique. Alors que le poids pronostique des anomalies chromosomiques est parfaitement démontré dans la plupart des hémopathies malignes aiguës, leur impact dans le MM est de démonstration récente. La majorité des anomalies pronostiques reconnues confèrent un pronostic défavorable (tableau 7).

Anomalies chromosomiques	Incidence MGUS (%)	Incidence MM (%)	Impact pronostique
Réarrangements IGH	60	> 50	Inconnu
t(11;14)	15-20	20	Neutre
t(4;14)	2-5	15	Défavorable +++
t(14;16)/t(14;20)	1	5	Défavorable +++
Hyperdiploïdie	50-60	50-60	Favorable +
Del(13)	30-50	45-50	Défavorable ++
Gains 1q	0	30-40	Défavorable ++
Del(17p)	0	10	Défavorable +++

Tableau 7 : Fréquence des principales anomalies chromosomiques et impact pronostique (d'après (Decaux et al, 2007)).

#### III.3.4.2.1 Délétion du bras long du chromosome 13

La première reconnue a été la perte partielle ou totale du chromosome 13, ou del(13) (Avet-Loiseau et al, 1999; Facon et al, 2001; Fonseca et al, 2002). Ces pertes (le plus souvent totales) de matériel génétique sont associées à une survie sans événement, mais aussi une survie globale,

significativement plus courtes. Un modèle pronostique combinant la délétion du chromosome 13 et la valeur de la bêta2-microglobuline sérique a été décrit (Facon et al, 2001). Plusieurs questions restent sources de débats quant au poids pronostique lié à la del(13). Une première question concerne le mode de détection de ces anomalies. Il semble en effet que leur mise en évidence par la cytogénétique conventionnelle confère un poids pronostique défavorable plus fort qu'une détection par FISH (Shaughnessy et al, 2003). Cette constatation n'est pas surprenante lorsque l'on connaît le poids pronostique de la prolifération plasmocytaire dans le MM. Par définition, la détection d'anomalies chromosomiques par la cytogénétique nécessite l'obtention de cellules en métaphases, et donc une prolifération substantielle. La détection par cytogénétique combine donc 2 facteurs de mauvais pronostic, la del(13) et la prolifération, expliquant l'impact pronostique supérieur. Mais il faut aussi prendre en compte que la cytogénétique n'est informative que dans 30 % des cas. La seconde question concerne le pourcentage de plasmocytes présentant la délétion. Récemment, l'IFM a montré que le poids pronostique était directement proportionnel à ce pourcentage (données non publiées). Enfin, la troisième question est la quantité d'information pronostique portée par la del(13) seule. La del(13) est fréquemment associée à d'autres anomalies chromosomiques comme la t(4;14) ou la del(17p), elles-mêmes associées à un pronostic défavorable. Des données récentes de l'IFM ont démontré que l'essentiel de l'information pronostique est porté par les autres anomalies, et non par la del(13) (Avet-Loiseau et al, 2007). Cette question est très importante pour la stratégie pronostique à développer, et demande d'autres études indépendantes.

#### *III.3.4.2.2 Translocation impliquant la région 14q32*

Les translocations t(4;14) et t(14;16) sont associées avec un pronostic redoutable (Moreau et al, 2002; Fonseca et al, 2003). Les données les plus solides concernent la t(4;14), essentiellement en raison de son incidence plus élevée. Toutes les données convergent vers une survie significativement plus courte, malgré un taux de réponse non différent des autres MM. Les données les plus matures sont sans doute celles de l'IFM, les patients présentant une t(4;14) ayant une survie médiane sans événement de l'ordre de 21 mois, malgré deux intensifications thérapeutiques avec autogreffe (Moreau et al, 2007). Ces patients pourraient bénéficier d'un traitement spécifique mais il reste à identifier. Les principales voies de recherche actuelles concernent l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité kinase du FGFR3, tout en gardant en mémoire

que près de 30 % des patients présentant une t(4;14) n'hyperexpriment pas la protéine FGFR3 (Keats et al, 2003). Les données concernant la t(14;16) sont plus parcellaires, mais concordent vers une survie significativement plus courte (Fonseca et al, 2003). Il est intéressant de noter que ces 2 translocations sont très rarement rencontrées dans les MGUS, probablement en raison d'une malignité intrinsèque liée à la dérégulation des gènes cibles (Avet-Loiseau et al, 2002).

#### *III.3.4.2.3 Délétion du bras court du chromosome 17*

Enfin, les délétions du bras court du chromosome 17, sont également associées avec un mauvais pronostic (Drach et al, 1998). A la différence des anomalies décrites précédemment, la del(17p) est sans doute un événement oncogénique secondaire, acquis au cours de l'évolution de la maladie. Son incidence au diagnostic est peu élevée (~10 %), rendant difficiles les analyses pronostiques. L'IFM a analysé 60 patients présentant une del(17p) et traités par deux intensifications thérapeutiques avec autogreffe médullaire. La survie médiane sans événement de ces 60 patients (tous âgés de moins de 65 ans) était de 17 mois. Ces patients sont candidats à des thérapeutiques spécifiques, tout le problème étant de définir une cible thérapeutique potentielle, et donc de comprendre la biologie de ce type de MM.

#### *III.3.4.2.4 Hyperdiploïdie et gains de copies du bras long du chromosome 1*

Certaines anomalies restent de pronostic incomplètement défini. Ainsi, l'hyperdiploïdie a été décrite comme étant associée à un pronostic favorable. Toutefois, les quelques études qui ont rapporté cet effet bénéfique reposaient sur la cytogénétique conventionnelle (qui n'explore que 30 % des patients), et mélangeaient tout type de traitement. Des études prospectives sont nécessaires, le principal problème résidant dans le mode d'étude de la ploïdie. Par ailleurs, plusieurs études de génomiques ont montré que les myélomes hyperdiploïdes n'étaient pas un sous groupe homogène de patients (Bergsagel et al, 2005; Chng et al, 2007). Nos données au sein de l'IFM semblent néanmoins confirmer cet effet bénéfique, même si le poids pronostique ne paraît pas majeur.

Une étude récente de l'équipe de Little Rock insiste sur le rôle pronostique majeur des gains de copies de 1q (Shaughnessy et al, 2005). Dans leur étude, ces gains représentent le principal facteur prédictif d'une survie courte, y compris avec des approches thérapeutiques extrêmement intensives. Le rôle pronostique de ces gains de 1q a été confirmé dans une cohorte de patients

traités dans les essais de l'IFM mais ce facteur pronostique disparaissait en analyse multivariée, recouvert par d'autres paramètres chromosomiques et non chromosomiques (Avet-Loiseau et al, 2007). Enfin, la t(11;14) semble être neutre en terme de pronostic.

#### III.3.4.2.5 Translocations c-myc

Les translocations c-myc n'ont aucun impact pronostique (Avet-Loiseau 2007).

#### III.3.4.2.6 Poids des différents marqueurs cytogénétiques

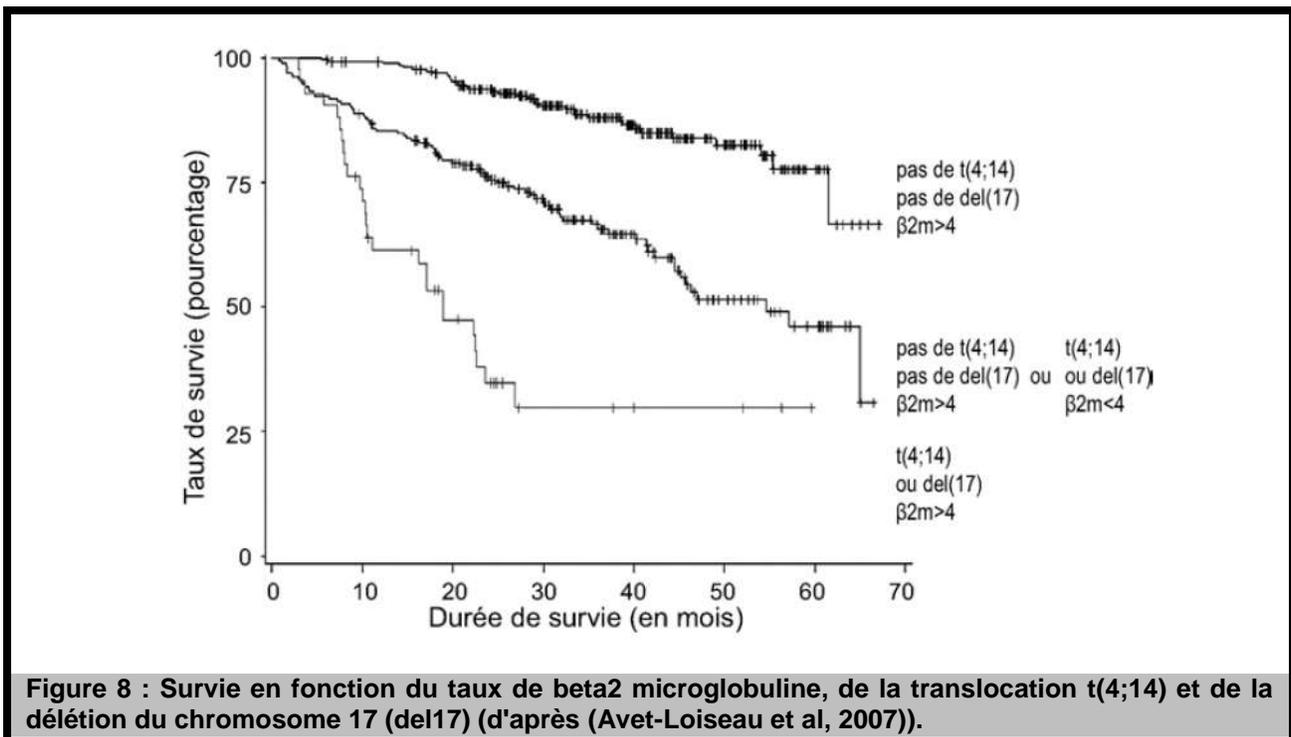
Pour essayer d'évaluer le poids de chacun de ces marqueurs cytogénétiques, une étude a été menée par l'IFM sur les 1 086 patients inclus dans les protocoles IFM99 (Avet-Loiseau et al, 2007). L'objectif était d'établir l'incidence et la pertinence clinique des anomalies génétiques dans ce grand groupe de patients traités par traitement intensif avec autogreffe et un suivi médian supérieur à 3 ans. La majorité des patients ont été analysés pour les anomalies chromosomiques suivantes: del(13), t(11;14), t(4;14), hyperdiploïdie, translocations c-myc, del(17p), et gains du 1q. Les résultats montraient que 90% des patients avaient des anomalies génétiques. La délétion du chromosome 13 (del(13)) était l'anomalie la plus fréquente (48%). La fréquence des autres anomalies chromosomiques était : hyperdiploïdie (39%), des gains 1q (35%), t(11;14) (21%), t(4;14) (14%), translocations c-myc (13%) et del(17p) (11%).

En analyse univariée, seules 2 anomalies chromosomiques n'étaient pas corrélées à la survie: t(11;14) et les translocations c-myc (tableau 8).

Genomic aberration	Impact on EFS, mo* (P)	Impact on OS† (P)
del(13)	29 vs 41 (< .001)	68% vs 83% (< .001)
t(11;14)(q13;q32)	35 vs 34 (.2)	80% vs 74% (.28)
t(4;14)(p16;q32)	20.6 vs 36.5 (< .001)	41.3 months vs 79% (< .001)
Hyperdiploidy	37 vs 33 (.02)	82% vs 70% (.006)
MYC translocations	35 vs 37 (.94)	72% vs 78% (.50)
del(17p)	15 vs 35 (< .001)	22 months vs 75% (< .001)

Tableau 8 : Impact des anomalies chromosomiques sur l'EFS et la survie globale (d'après (Avet-Loiseau et al, 2007)).

Une analyse multivariée incluant des facteurs cytogénétiques et biologiques a retenu 3 variables indépendantes ayant un impact sur la survie : del(17p), ( $p < 0,001$ , rapport de risque = 3,93),  $\beta 2$  microglobuline sérique supérieure à 4mg/l, ( $p < 0,001$ , rapport de risque = 2,83) et t(4;14), ( $p < 0,001$ , rapport de risque = 2,78). La figure 8 illustre l'impact pronostique sur la survie de la translocation t(4;14) et de la délétion du bras court du chromosome 17 en combinaison avec le taux de bêta2-microglobuline sérique. Ce modèle pronostique performant remplace le modèle combinant la délétion du chromosome 13 et le taux de beta2-microglobuline sérique.



Les médecins de la Mayo Clinic ont défini un score baptisé mSMART pour identifier les myélomes à haut risque (Stewart et al, 2007; Kyle et al, 2009). Les critères inclus dans ce score sont :

- en cytogénétique conventionnelle : présence d'une hypodiploïdie ou d'une délétion du chromosome 13
- en FISH : présence d'une t(4 ;14), d'une t(14 ;16) ou d'une del17p
- un index de prolifération plasmocytaire supérieur à 3%

La présence d'un de ces facteurs suffit à définir un patient comme à haut risque. Environ 25% des patients sont ainsi considérés comme à haut risque. Les autres patients, notamment les patients ayant une t(11 ;14) une t(6 ;14) ou une hyperdiploïdie, sont considérés comme à risque standard.

#### ***III.3.4.3 Impact des nouvelles drogues du myélome***

Les données décrites sont issues de cohorte de patients traités par chimiothérapies conventionnelles ou traitements intensifs avec autogreffe. L'impact des anomalies cytogénétiques décrites ne semble pas être le même chez des patients traités avec les nouvelles drogues du myélome. Plusieurs études ont montré que le bortezomib effaçait le mauvais pronostic conféré par la t(4 ;14) ou la del13 (Jagannath et al, 2007; Sagaster et al, 2007). Dans l'étude VISTA, les 26 patients ayant une anomalie cytogénétique de mauvais pronostic (t(4 ;14), t(14 ;16) ou del 17p) avait le même taux de RC (28%) que les 142 patients n'ayant aucune de ces anomalies (San Miguel et al, 2008). Le TTP et la survie des ces deux groupes étaient identiques (p=0,55 et p=0,99).

Une étude sur 130 patients traités par lenalidomide – dexaméthasone a montré que les patients ayant une t(4 ;14) et une del13 avaient un TTP et une survie identiques aux autres patients (Reece et al, 2009). En revanche, le TTP et la survie étaient moins bons chez les patients ayant une del17 traitée par lenalidomide. Sur une étude de 100 patients traités par lenalidomide, Kapoor a montré que les patients identifiés comme de mauvais pronostic avec le score mSMART de la Mayo Clinic avaient une PFS et un TTP plus courts que les patients à risque standard (Kapoor et al, 2009). La survie globale n'était cependant pas diminuée.

Des études complémentaires sur des cohortes plus importantes de patients sont nécessaires pour décrire plus clairement l'impact des anomalies cytogénétiques chez les patients traités par les nouvelles drogues du myélome. Cependant, les données déjà disponibles permettent d'envisager dans un avenir proche des stratégies thérapeutiques personnalisées (par exemple, en évitant la prescription de lenalidomide chez les patients ayant une del(17p) si les résultats de Reece se confirment).

#### ***III.3.4.4 Impact des anomalies génétiques***

Les données récemment obtenues sur la cytogénétique du MM par différentes équipes à travers le monde permettent de conclure à l'impact majeur de la génétique sur la survie des patients.

Compte tenu des différences de survie obtenues, la recherche de ces anomalies au diagnostic est devenue un élément incontournable dans la définition du pronostic, et donc dans la mise en place de la stratégie thérapeutique du MM. Un groupe d'experts réunis sous l'égide de l'IMWG a présenté ses recommandations lors du dernier Myeloma Workshop de Washington (<http://www.mw-delhi09.com/spargoDocs/Consensuspaneltwo.pdf>). Les experts recommandent de pratiquer chez tous les patients au diagnostic une analyse des plasmocytes médullaires en cytogénétique standard et en FISH pour rechercher : une délétion du chromosome 13 ou de son bras long (en cytogénétique standard uniquement), un t(4;14), une t(14;16), une del17. Cependant, avec la généralisation de l'utilisation des nouvelles drogues, l'impact pronostic de certaines de ces anomalies va probablement disparaître. Il est nécessaire de prévoir de nouvelles études pour analyser l'impact des facteurs pronostiques génétiques chez les patients traités par des combinaisons comprenant un ou plusieurs des nouveaux traitements du myélome. Il est également important de rechercher de nouvelles anomalies génétiques pouvant être associées à la réponse aux nouveaux traitements.

Les analyses en FISH offrent l'avantage d'être utilisable en routine. Leur principal inconvénient est de ne prendre en compte que des anomalies ciblées et connues. Elles ne reflètent qu'une partie de l'hétérogénéité génétique du myélome et de la biologie de la maladie. Par ailleurs, elles ne peuvent pas permettre la découverte de nouvelles anomalies. Compte tenu de l'instabilité génétique du myélome, il existe de nombreuses anomalies génétiques rendant difficiles l'identification des anomalies significatives. Alors que la majorité des anomalies génétiques sont probablement liées au hasard et représentent un « bruit de fond », les anomalies génétiques pertinentes et pronostiques peuvent être minimes. Ainsi, alors que la del13 a été longtemps considérée comme un facteur pronostic majeur dans le myélome, les données récentes de l'IFM indiquent que l'essentiel de l'information pronostique est porté par les autres anomalies, et non par la del(13) (Avet-Loiseau et al, 2007). Cette information n'a pu être obtenue qu'après étude d'un grand nombre de patients.

### **III.3.5 Etude de génomique – puces à ADN**

Les puces à ADN sont des supports solides sur lesquels sont disposés, de manière ordonnée, des milliers de molécules d'ADN correspondant aux gènes que l'on souhaite analyser. Les puces à

ADN permettent soit de mesurer des pertes ou des gains de chromosomes, de détecter des pertes d'hétérozygotie sur l'intégralité du génome si la cible marquée est de l'ADN génomique, soit de mesurer des niveaux d'expression de l'ensemble des gènes du génome si la cible marquée est de l'ARN (génomique transcriptionnelle). Leur analyse, basée sur le principe de l'hybridation moléculaire, permet d'effectuer des études jusqu'alors réalisées au moyen des techniques classiques de biologie moléculaire (*northern-* ou *southern-blots*), mais avec deux différences majeures : l'immobilisation de la séquence génomique connue sur un support solide et une miniaturisation qui permet d'intégrer de nombreuses cibles en parallèle. L'utilisation des puces à ADN offre un large champ d'applications, tant fondamentales que cliniques.

De développement récent, ces techniques permettent de s'affranchir du « bruit de fond » de l'instabilité génétique du MM. Les études menées par quelques équipes dans le monde, dont la nôtre, ont permis d'éclater le MM en plusieurs entités nosologiques, de définir de nouvelles cibles thérapeutiques et de définir des marqueurs prédictifs de la survie ou de la réponse aux traitements permettant d'envisager une prise en charge plus individualisée du MM.

Les premières études étaient des analyses de génomique transcriptionnelle (étude des profils d'expression génique). Les études de génomique transcriptionnelle menées par notre équipe sont l'objet de cette thèse et vont être présentées dans le chapitre V (Etude des profils d'expression génique dans le myélome multiple).

# IV. Génomique transcriptionnelle (Etudes des profils d'expression génique)

## IV.1 Historique

Les premières puces à ADN ont été décrites par Schena il y a environ 15 ans. Il s'agissait de lames de verre sur lesquelles étaient déposés des fragments d'ADN complémentaire. Deux échantillons d'ARN étaient marqués par deux fluorochromes différents et hybridés simultanément sur la même puce. Le ratio des intensités permettait d'estimer l'expression relative des gènes étudiés. Dans une première étude, le nombre de fragments d'ADN déposés sur les puces était 48 et les échantillons testés étaient issus d'une plante (*Arabidopsis thaliana*) soit sauvage, soit transgénique (Schena et al, 1995). Dans une seconde étude, la même équipe a utilisé des puces comportant 1 056 fragments d'ADN pour comparer des échantillons d'ARN issus de cellules humaines de la lignée Jurkat et des échantillons d'*Arabidopsis thaliana* (Schena et al, 1996). Ces travaux ont montré qu'il était possible de mesurer chez l'homme l'expression simultanée d'un grand nombre de gènes. Depuis la description de ces premières puces à ADN, les progrès technologiques ont permis le développement de puces à oligonucléotides correspondant à l'ensemble des 35 000 gènes humains dont l'expression peut ainsi être analysée simultanément.

Rapidement, cette technologie a été utilisée pour l'étude des cancers. Ainsi en 1996, DeRisi utilisait une puce comportant 1 161 fragments d'ADN pour étudier une lignée cellulaire humaine de mélanome (UACC-903) (DeRisi et al, 1996). Les auteurs ont comparé le profil d'expression de cette lignée cellulaire cancéreuse de mélanome avec le profil de la même lignée dont le phénotype cancéreux avait été annulé par l'introduction du chromosome 6 et ont pu ainsi identifier plusieurs gènes potentiellement responsables du caractère tumoral. Initialement, les études portaient sur des cultures de lignées cellulaires pour diminuer « le bruit de fond ». Depuis, de nombreuses études ont été menées sur des cellules issues de patients dans les cancers solides et les hémopathies malignes et ont montré l'intérêt de l'étude des profils d'expression génique pour la classification des cancers.

## IV.2 Types d'analyse utilisés pour l'étude des niveaux d'expression des gènes

Schématiquement, deux types d'analyse sont utilisés dans l'étude des profils d'expression génique dans les cancers (Baron et al, 2007; Minvielle 2007) :

- **analyse de regroupement hiérarchique non supervisée** : Cette approche consiste à rechercher, sans a priori, de nouveaux sous-groupes dans une tumeur sur la base de signatures d'expression génique communes. Elle utilisait initialement le programme Cluster développé par Eisen et al. à Stanford (programme disponible sur <http://rana.lbl.gov>). Les échantillons les plus similaires sont regroupés entre eux sur la base de leur profil d'expression des gènes analysés. Parallèlement, les gènes corrélés entre eux sont également regroupés sur la base de leurs niveaux d'expression dans les échantillons étudiés. Le degré de similarité des échantillons ou des gènes entre eux est évalué par le coefficient de corrélation de Pearson, calculé sur la base des niveaux d'expression génique. Ces corrélations permettent de regrouper les profils les plus similaires entre eux, sous la forme d'un dendrogramme, les longueurs des branches reliant les échantillons reflètent le degré de similarité entre ces échantillons. Un arbre du même type peut être tracé au niveau des gènes, en mesurant les corrélations d'expression des gènes à travers les différents échantillons. Une représentation graphique sous forme d'une matrice de couleur est ensuite couplée à cette classification et permet la visualisation de l'ensemble des résultats. Dans cette représentation, les lignes correspondent aux gènes et les colonnes aux échantillons, les niveaux de couleurs reflètent les niveaux d'expression génique. L'échelle de couleur va du vert au rouge. Les valeurs relatives les plus faibles sont en vert, les plus fortes en rouge et celles proches de la médiane en noir. Cette représentation est effectuée par le programme Treeview (disponible sur <http://rana.lbl.gov>). Cette vue d'ensemble est indispensable pour s'assurer de la qualité des expériences et avoir une idée globale des gènes activés ou réprimés. Elle permet de mettre en évidence rapidement les groupes de gènes les plus contrastés et de tenter de définir des signatures biologiques distinguant différentes classes d'échantillons. L'utilisation de cette approche a montré qu'elle permettait une classification des tumeurs aussi efficace que les méthodes classiques, mais surtout, dans certains cas, l'identification

de nouvelles classes de tumeurs mieux corrélées avec le devenir des patients (Alizadeh et al, 2000).

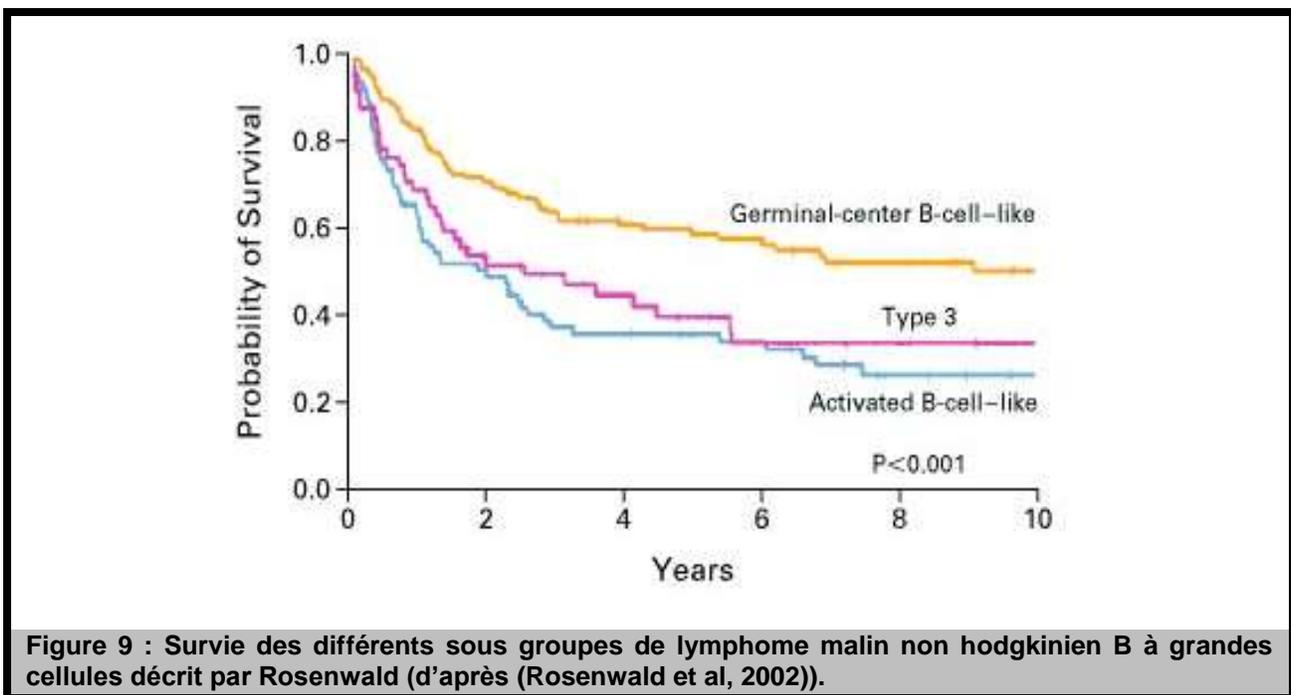
- **analyse supervisée (prédiction de classe)** : Cette approche consiste à comparer des groupes prédéfinis d'échantillons (par exemple plasmocytes normaux et tumoraux) et permet d'identifier les gènes les plus discriminants entre les différents groupes. Par extension, les gènes identifiés permettent de prédire l'appartenance à un groupe.

Ces deux approches ont été utilisées dans différents cancers et hémopathies malignes et ont permis d'améliorer la classification des tumeurs, d'étudier les voies d'oncogénèse, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de prédire la survie des patients. Les études menées dans les leucoses aiguës et les lymphomes malins non hodgkiniens illustrent ces deux approches et les différents renseignements que peuvent apporter les profils d'expression génique : physiopathologie, classification, prédiction.

#### **IV.2.1 Analyse non supervisée**

Cette approche a été utilisée par Alizadeh pour analyser les données d'expression de 40 échantillons de lymphome malin non hodgkinien B à grandes cellules (LNHGC) et les comparer à celles de cellules normales de la lignée B à différents stades de différenciation (Alizadeh et al, 2000). L'analyse non supervisée a mis en évidence une hétérogénéité des profils d'expression génique des LNHGC permettant d'identifier deux groupes. Chaque groupe était associé à une étape distincte de la différenciation des lymphocytes. Un groupe présentait une signature d'expression proche de celle des lymphocytes B normaux issus d'un centre germinatif (groupe « centre germinatif ») et l'autre proche de celle des lymphocytes B du sang circulant activés in vitro par des anticorps anti IgM (groupe « B activés »). Cette hétérogénéité moléculaire était associée à une évolution clinique différente. Les patients du groupe « centre germinatif » avaient une survie prolongée par rapport aux patients du groupe « B activés ». Alors que la survie globale à 5 ans de l'ensemble des patients était de 52%, elle était respectivement estimée à 76% et 16% chez les patients des groupes « centre germinatif » et « B activés ». La valeur pronostique de cette classification était indépendante de celle de l'index pronostique international des lymphomes (IPI).

Ces données ont été validées par Rosenwald sur une cohorte indépendante de 240 patients (Rosenwald et al, 2002). L'analyse non supervisée identifiait 3 groupes de patients : un groupe « centre germinatif » (115 patients - 48%), un groupe « B activé » (73 patients – 30%) et un groupe appelé « type 3 » qui n'exprimait aucune des deux signatures (51 patients – 21%). Ces trois sous groupes n'étaient pas reliés à un type histologique particulier et n'étaient pas corrélés avec les groupes de risque définis par l'IPI. La survie des patients après chimiothérapie était différente entre les groupes. La survie à 5 ans était estimée à 60% pour le groupe « centre germinatif », 39% pour le groupe « type 3 » et 35% pour le groupe « B activé » (figure 9).

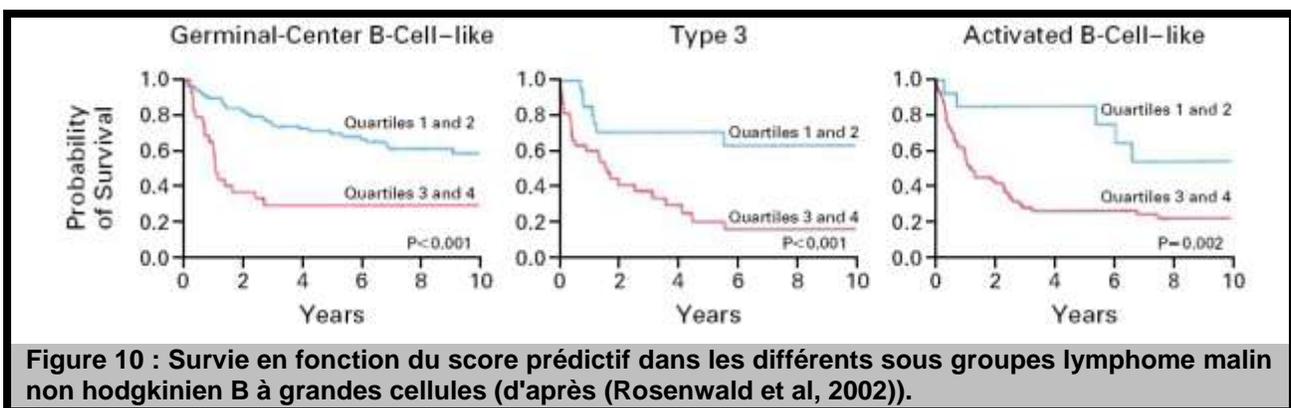


#### IV.2.2 Analyse supervisée :

Golub a comparé les profils d'expression génique de 27 cas de leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) et 11 cas de leucémie aigüe myéloblastique (LAM) pour identifier les gènes dont l'expression est corrélée au type de leucémie aigüe (Golub et al, 1999). L'analyse statistique a identifié 1 100 gènes dont l'expression est différente entre LAL et LAM. Les 50 gènes les plus discriminants ont ensuite été sélectionnés et un score résumant l'expression de ces 50 gènes a été créé. La valeur de ce score a été utilisée pour prédire le type de leucose aigüe des patients. L'utilisation de ce score classait correctement 36 patients sur les 38 de la cohorte initiale. Il a été

testé sur une cohorte de validation indépendante et classait correctement 29 patients sur 34. L'utilisation des profils d'expression génique a donc permis la construction d'un score permettant de prédire le type de leucose aigüe. Plus récemment, l'équipe d'Haferlach a montré que les 100 gènes les plus discriminants entre les 12 sous-types diagnostiques de leucémie pouvaient prédire l'appartenance à l'un de ces sous-groupes avec une précision de 95,1 % (Haferlach et al, 2005). Dans une étude de pharmacogénomique, Holleman a identifié 124 gènes associés à la résistance des cellules leucémiques à quatre agents anticancéreux (prednisolone, vincristine, asparaginase et daunorubicine). Cette combinaison de gènes était prédictive de la rechute (Holleman et al, 2004).

Dans son étude sur 240 cas de LNHGC, Rosenwald (Rosenwald et al, 2002) a identifié les gènes dont l'expression était corrélée à la survie des patients. Les 17 gènes les plus discriminants ont été associés pour élaborer un score permettant de classer les patients. La survie des patients était corrélée à la valeur du score. Les patients ont été séparés en quartiles sur la base de la valeur de ce score. La survie était très différente en fonction du quartile. Le score ainsi défini et l'IPI était indépendant. Le score permettait notamment d'identifier des patients ayant une survie prolongée au sein du groupe des patients de mauvais pronostic selon l'IPI (IPI élevé). Ce score était un meilleur prédicteur que la classification moléculaire car il permettait d'identifier des sous groupes de patients ayant une survie différente au sein des groupes « centre germinatif », « B activé » et « type 3 » (figure 10).



Des études ont également été menées dans des cancers solides et notamment dans les cancers du sein et les cancers pulmonaires. Ainsi, un groupe néerlandais a identifié et validé dans le cancer du sein une signature de mauvais pronostic composée de 70 gènes (van 't Veer et al, 2002),

prédictive de la survenue précoce de métastase. Dans une étude plus large, cette équipe a montré que ce prédicteur moléculaire était plus puissant pour prédire l'évolution de la maladie chez les jeunes patientes que le système de classification habituel basé sur des critères cliniques et biologiques (van de Vijver et al, 2002).

### **IV.3 Amélioration des connaissances de la physiopathologie des pathologies étudiées**

L'analyse des gènes discriminants entre les sous-groupes permet d'améliorer les connaissances de la physiopathologie des pathologies étudiées. Ainsi, dans l'étude de Golub (Golub et al, 1999), les gènes discriminants étaient des gènes associés à la différenciation B mais également des gènes impliqués dans différents processus cellulaires (cycle cellulaire, transcription, adhésion cellulaire), des oncogènes (c-MYB, E2A) et un gène codant pour la principale cible de l'etoposide (topoisomérase II). Ainsi, les gènes identifiés comme discriminants entre deux groupes de patients permettent de prédire l'appartenance à un groupe mais peuvent également permettre d'améliorer les connaissances de la physiopathologie ou de la pharmacologie.

Ces résultats prouvent que les profils d'expression génique permettent d'identifier des sous groupes de patients au sein de cohortes apparemment homogènes sur les critères clinico-biologiques et histologiques habituels. Ces résultats illustrent les deux principaux objectifs de l'étude du transcriptome. Le premier est scientifique visant à une meilleure compréhension de la physiopathologie des tumeurs et de leurs mécanismes d'oncogenèse. Il utilise la comparaison des cellules tumorales entre elles ou avec les cellules saines correspondantes. L'autre objectif est d'ordre médical et vise à améliorer le diagnostic, l'évaluation du pronostic et la prise en charge thérapeutique des patients par confrontation des données de transcriptome avec les renseignements cliniques.

# V. Etude des profils d'expression génique dans le myélome multiple

Les premières études de génomique transcriptionnelle dans le myélome ont été menées au début des années 2000. Les travaux initiaux étaient des études de faisabilité et de validation de la technique. Initialement, elles concernaient principalement la physiopathologie des plasmocytes malins. Le recul était insuffisant pour corrélérer les données d'expression avec les données cliniques, la réponse au traitement ou la survie. Par la suite, des études sur des cohortes importantes de patients ont démontré l'hétérogénéité génétique du myélome et ont conduit à proposer des classifications moléculaires du myélome. Plus récemment, des études couplant l'analyse des profils d'expression génique avec les données cliniques et évolutives des patients ont permis d'identifier des marqueurs moléculaires prédictifs de la survie ou de la réponse aux traitements. Enfin, des études ont été menées sur des lignées de myélome exposées à différents traitements et ont permis de comprendre les mécanismes d'action des traitements et de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Ces études ont été menées concurremment dans notre équipe et dans d'autres laboratoires dans le monde, notamment par l'équipe de Shaugnessy à Little Rock (University of Arkansas for Medical Sciences). Ces travaux vont être présentés en parallèle dans les pages suivantes.

## V.1 Faisabilité et mise en évidence de gènes non reliés à la physiopathologie du myélome

L'équipe de De Vos a été la première à utiliser l'étude des profils d'expression génique dans le myélome. Les auteurs ont utilisé une puce correspondant à 268 gènes impliqués dans des voies de signalisation variées (De Vos et al, 2002). Les échantillons analysés étaient 6 lignées de myélome, 4 lignées B lymphoblastoïdes (induits chez des patients à partir de B périphériques par infection EBV) et des plasmocytes médullaires prélevés chez un patient atteint de myélome. L'analyse non supervisée séparait les échantillons en deux groupes, l'un correspondant aux lignées de myélome et aux plasmocytes de myélome et l'autre correspondant aux lignées B lymphoblastoïdes. L'analyse de l'expression des gènes discriminants trouvait une surexpression

relative des récepteurs de l'IL6 (IL6 R) et de l'IGF1 (IGF1 R) dans les lignées de myélome. Ces observations correspondaient à des données biologiques connues dans le myélome et permettaient de valider la technique utilisée. Par ailleurs, l'analyse trouvait une surexpression relative de gènes impliqués dans des voies de signalisation qui n'étaient pas reliées au myélome. Les résultats ont été confirmés par RT-PCR et western blot montrant la corrélation entre les résultats des profils d'expression génique, la synthèse d'ARN et la synthèse protéique.

Plus récemment, Claudio a combiné une approche de séquençage d'ADN à haut débit et d'étude du profil d'expression génique à partir d'ARN issu de plasmocytes médullaires de myélome et de plasmocytes circulants issus d'une leucémie à plasmocytes (Claudio et al, 2002). Avec cette double approche, les auteurs ont identifié 9 732 gènes exprimés par les plasmocytes malins. A partir de cette liste de gènes, une puce correspondant à 4 300 gènes a été établie et utilisée pour analyser les profils d'expression génique de 18 lignées de myélome et 6 lignées hématologiques non myélomateuses. Cette analyse a permis d'identifier 52 gènes discriminants entre les deux types de lignées. Certains de ces gènes sont impliqués dans la biologie des plasmocytes (CD138, XBP1,...), d'autres correspondent à des gènes sans lien connu avec la biologie des plasmocytes (HSP 70, TRA1,...). Les données d'expression ont été contrôlées par RT-PCR.

Ces deux premières études :

- ont démontré que l'analyse des profils d'expression génique de plasmocytes était possible.
- ont participé à la validation de la technologie par l'obtention de résultats conformes à ceux obtenus avec d'autres approches (RT-PCR, western blot,...).
- ont démontré que l'étude des profils d'expression génique pouvait permettre la description de nouveaux gènes impliqués dans la physiopathologie du myélome.

## V.2 Comparaison des plasmocytes malins avec des plasmocytes normaux

Les plasmocytes malins de myélome proviennent de la transformation maligne de plasmocytes médullaires normaux. Par ailleurs, dans la majorité des cas, le myélome est précédé par l'apparition d'une MGUS qui représente un véritable stade pré-tumoral du myélome. La comparaison des profils d'expression génique de plasmocytes normaux et tumoraux permettait d'envisager une meilleure connaissance des mécanismes de l'oncogenèse du myélome. Cependant, l'analyse des plasmocytes normaux est difficile car, chez un individu sain, le pourcentage de plasmocytes médullaires est très faible inférieur à 1%. Pour contourner cette difficulté, deux approches différentes ont été menées à la même période :

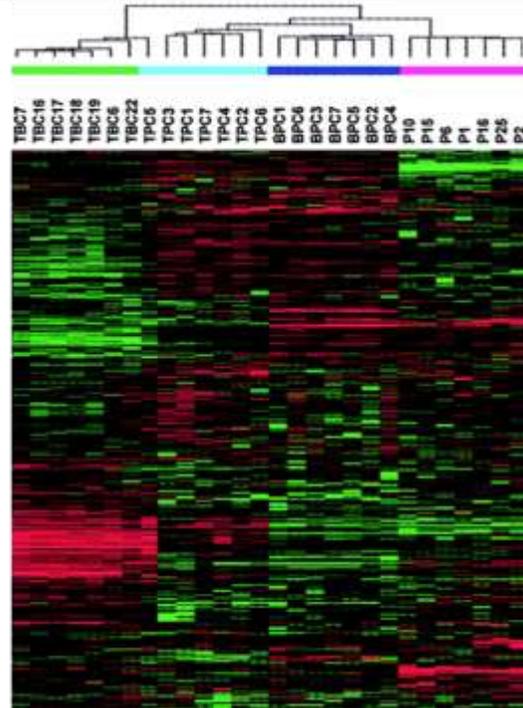
- l'équipe de Shaughnessy a utilisé une méthode de purification immuno magnétique des plasmocytes médullaires basée sur l'expression du CD138 (Zhan et al, 2003).
- l'équipe de Klein a développé une méthode de différenciation in vitro des cellules B circulantes en plasmablastes polyclonaux (Tarte et al, 2002).

Zhan a comparé les profils d'expression génique de plasmocytes médullaires provenant de 74 myélomes au diagnostic, 5 MGUS , 7 lignées de myélome et 31 donneurs sains (Zhan et al, 2002). Les plasmocytes médullaires étaient purifiés par tri immunomagnétique sur la base de l'expression du CD138. Les biopuces utilisées étaient des biopuces commerciales à oligonucléotides correspondant à environ 6 800 gènes. L'analyse non supervisée séparait les échantillons en deux branches, l'une correspondant aux plasmocytes normaux et à une MGUS et l'autre correspondant aux myélomes, aux lignées et aux MGUS. Cette répartition montrait que les plasmocytes malins de myélome pouvaient être distingués des plasmocytes normaux par leur profil d'expression génique. Par ailleurs, la deuxième branche comprenait deux sous-branches, l'une incluant toutes les MGUS et l'autre les lignées. Les plasmocytes malins étaient ainsi classés en deux groupes, l'un ayant un profil d'expression génique proche des MGUS et l'autre proche des lignées de myélome. Cette analyse révélait aussi que les plasmocytes de MGUS et de myélome ne pouvaient être différenciés sur la base de leurs profils d'expression génique.

Les plasmocytes normaux avaient une surexpression relative des gènes codant pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité et pour les immunoglobulines. Ce résultat était attendu puisque les plasmocytes malins ne sécrètent qu'une seule immunoglobuline monoclonale contrairement aux plasmocytes normaux qui sécrètent des immunoglobulines polyclonales. Cent vingt autres gènes étaient discriminants entre plasmocytes normaux et malins. Parmi les 50 gènes sous exprimés dans les plasmocytes malins, l'un des plus discriminants était le CD27 qui est impliqué dans la différenciation des lymphocytes B mémoire en plasmocytes. Le CD27 peut aussi induire l'apoptose. Les autres gènes correspondaient à des molécules d'adhésion, des cascades de signalisation, des chimiokines. Les 70 gènes surexprimés dans les plasmocytes malins étaient des oncogènes (c-myc, c-abl,...) et de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme, la transcription et la transmission du signal. Des analyses en cytométrie de certains marqueurs de surface ont montré que les données d'expression des gènes étaient corrélées à l'expression de la protéine, validant la pertinence de la technique utilisée.

Dans une seconde étude, cette équipe a cherché à identifier des gènes impliqués dans la différenciation des plasmocytes en comparant les profils d'expression de cellules B CD19 + issus d'amygdales avec des plasmocytes provenant d'amygdales ou de moelle normale et des plasmocytes médullaires malins de myélome (Zhan et al, 2003). L'analyse non supervisée séparait les cellules B et les plasmocytes en deux branches distinctes (figure 11). Par ailleurs, les auteurs ont identifié 359 gènes discriminants entre les cellules B d'amygdales et les plasmocytes d'amygdales et 500 gènes discriminants entre plasmocytes d'amygdales et de moelle.

**Lymphocytes B amygdales**  
**Plasmocytes amygdales**  
**Plasmocytes moelle osseuse**  
**Plasmocytes médullaire de myélome**



**Figure 11 : Représentation graphique des profils d'expression de lymphocytes B issus d'amygdales, de plasmocytes normaux d'amygdales, de plasmocytes médullaires normaux et de plasmocytes médullaires de myélome. En analyse non supervisée, les lymphocytes et les plasmocytes sont répartis en deux branches distinctes (d'après (Zhan et al, 2003)).**

A la même période, Tarte a développé une méthode de différenciation in vitro des cellules B circulantes en plasmablastes polyclonaux (Tarte et al, 2002). Ces cellules produisaient des chaînes légères polyclonales et des immunoglobulines avec une proportion plus importante d'IgM. Leur aspect cytologique était proche de plasmablastes. L'analyse de ces cellules en cytométrie montrait qu'elles avaient les caractéristiques majeures des cellules plasmablastiques proches de celles de plasmocytes issus d'amygdales ou des plasmocytoses réactionnelles. Cette méthode permettait l'obtention d'une grande quantité de plasmablastes polyclonaux à partir de cellules B circulantes de patients ou de sujets sains. Les auteurs ont comparé les profils d'expression génique de ces plasmablastes polyclonaux avec ceux de plasmocytes de sujets sains, de myélome, de plasmocytose réactionnelle, de lignées de myélome et avec ceux de lignées B lymphoblastoïdes (EBV induite) et de cellules B circulantes. L'analyse non supervisée sépare les échantillons en deux groupes, l'un correspondant aux cellules B circulantes et aux lignées B lymphoblastoïdes et l'autre correspondant aux plasmocytes et aux plasmablastes polyclonaux.

Les plasmablastes induits in vitro par différenciation des cellules B circulantes avaient donc une signature d'expression génique plus proche de celle des plasmocytes que des cellules B dont ils étaient issus. La comparaison des profils d'expression génique des cellules B et des plasmablastes montrait une surexpression relative dans les plasmablastes des gènes codant pour le CD38, le CD27, les immunoglobulines, XBP1, le récepteur à l'IL6,... A l'inverse, les gènes codant pour le CD20, CD21, CD69 et les molécules HLA de classe II étaient sous exprimés dans les plasmablastes. L'ensemble de ces résultats correspondaient à des données déjà connues et permettaient ainsi de confirmer la fiabilité des analyses des profils d'expression génique. La branche des plasmocytes était séparée en deux sous-branches, l'une comportant les plasmablastes polyclonaux, les plasmocytes de plasmocytose réactionnelle et l'autre correspondant aux plasmocytes normaux et malins. La comparaison des profils d'expression génique des plasmablastes polyclonaux avec des plasmocytes malins révélait la surexpression relative de 50 gènes dans les plasmocytes de myélome dont 5 antigènes de tumeurs (MAGE1, MAGE2, MAGE3, GAGE6 et SSX2) et un activateur de c-myc, MSSP.

Dans une seconde étude, Tarte a comparé les profils d'expression génique de plasmablastes polyclonaux, de plasmocytes issus d'amygdales ou de moelle normale et de cellules B purifiées à partir de sang ou d'amygdales (Tarte et al, 2003). L'analyse non supervisée permettait de bien distinguer les 5 types cellulaires sur la base de leur signature d'expression. La comparaison des gènes différenciellement exprimés entre ces cellules à différents stades de maturation a permis de mettre en évidence des gènes potentiellement impliqués dans la différenciation des plasmocytes.

Toutes ces études sont intéressantes et ont mis en évidence des dérégulations de gènes impliquées dans la différenciation des plasmocytes et potentiellement dans l'oncogenèse du myélome. Cependant, en l'absence de corrélation avec les données cliniques ou biologiques de patients, ces données ne permettent pas d'améliorer la prise en charge des patients.

Par la suite, des études analysant les profils d'expression génique de plasmocytes purifiés à partir de prélèvements médullaires de patients ont été menées permettant de proposer des classifications moléculaires des myélomes et de mettre en évidence des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'apparition de complications du myélome et notamment des atteintes osseuses.

### V.3 Premières classifications moléculaires du myélome

A l'instar de ce qui avait été fait dans les lymphomes, Zhan a utilisé les données des profils d'expression génique pour essayer de définir différents groupes de myélome. Dans sa première étude (Zhan et al, 2002), l'analyse non supervisée des profils d'expression des 74 cas de myélome multiple a mis en évidence l'existence de quatre groupes distincts dont un groupe plus proche des lignées cellulaires issues de myélomes multiples (baptisé MM4) et un autre groupe (MM1) plus proche des plasmocytes de MGUS. Les gènes les plus discriminants entre MM1 et MM4 codaient pour des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN. Ces données suggéraient que les myélomes du groupe MM4 étaient plus proliférants. Les auteurs ont étudié les corrélations entre ces 4 groupes et les données cliniques et biologiques. Le groupe MM4 était associé à la présence de plusieurs facteurs de mauvais pronostic : taux de beta 2-microglobuline sérique élevé, anomalies cytogénétiques, .... suggérant que ce groupe pourrait avoir une survie plus courte. Mais le recul évolutif était insuffisant pour pouvoir observer des différences de survie.

Les gènes discriminants entre cellules B d'amygdales et plasmocytes identifiés par Zhan (Zhan et al, 2003) ont été utilisés pour comparer les 74 cas de myélomes aux cellules normales. L'analyse non supervisée montrait que la répartition des myélomes n'était pas homogène et que des groupes de myélome avaient des similitudes d'expression avec les cellules normales. Les myélomes du groupe MM2 pouvaient ainsi être reliés aux plasmocytes médullaires, les MM3 aux plasmocytes d'amygdales et les MM4 aux cellules B d'amygdales. Les MM1 n'étaient proches d'aucune des signatures géniques de cellules normales. Cette étude montrait donc que des gènes dont l'expression est corrélée au stade de différenciation des plasmocytes pouvaient permettre de classer les myélomes entre eux. Pour autant, faute d'un recul évolutif suffisant, aucune corrélation de cette classification avec les données cliniques et évolutives n'a pu être établie.

## V.4 Compréhension de la transition entre plasmocytes normaux, MGUS et myélome.

Un des enjeux majeurs est de comprendre les mécanismes impliqués dans l'oncogenèse du myélome. Pour essayer d'atteindre cet objectif, Davies a comparé les profils d'expression génique de plasmocytes médullaires normaux et de plasmocytes de MGUS ou de myélome (Davies et al, 2003). L'analyse supervisée a permis d'identifier 273 gènes discriminants entre plasmocytes normaux et MGUS, 360 entre plasmocytes normaux et myélome et 74 entre MGUS et myélome (figure 12). Ainsi, les différences de signature d'expression entre MGUS et myélome étaient plus faibles qu'entre plasmocytes normaux et myélome.

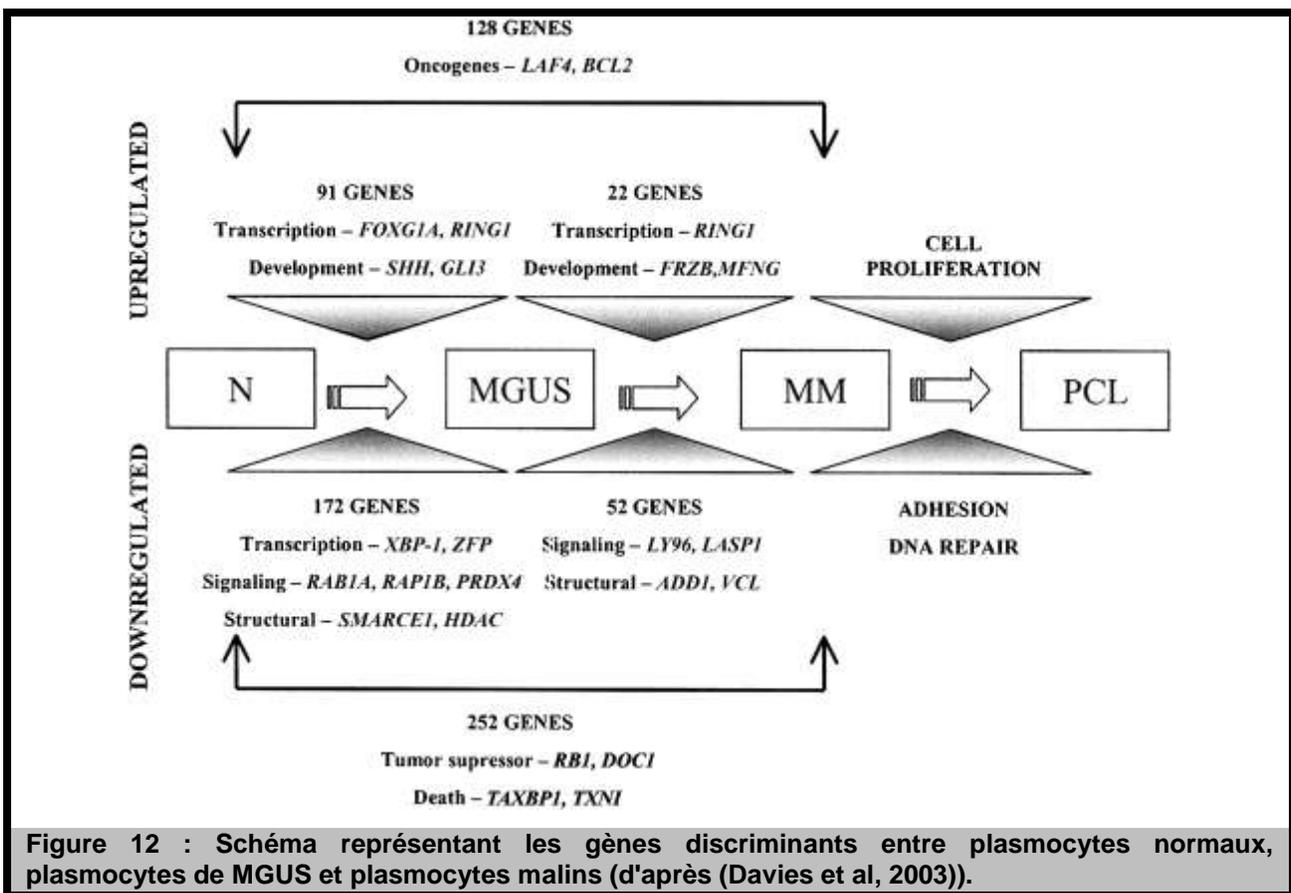


Figure 12 : Schéma représentant les gènes discriminants entre plasmocytes normaux, plasmocytes de MGUS et plasmocytes malins (d'après (Davies et al, 2003)).

Les données d'expression ont été en partie validées par RT-PR ou cytométrie. La majorité des gènes discriminants étaient sous exprimés dans les plasmocytes de MGUS ou de myélome. Ils codaient pour des protéines impliquées dans des voies de signalisation, la transcription,... L'expression de quelques gènes était dérégulée de manière progressive entre plasmocytes

normaux, MGUS et myélome. Certains de ces gènes semblaient liés dans la physiopathologie du myélome. Ainsi, plusieurs gènes étaient impliqués dans la voie Wnt qui a été identifiée comme active dans le myélome multiple. Cette voie est impliquée dans la différenciation et la croissance des ostéoblastes et donc dans la formation osseuse. Une inhibition de la voie Wnt s'accompagne d'une diminution de la formation osseuse. Deux des gènes surexprimés dans les myélomes (FRZB et DKK1) sont des inhibiteurs de la voie Wnt et pourraient ainsi participer à l'apparition d'une atteinte osseuse dans le myélome. L'implication de DKK1 dans les atteintes osseuses du myélome a, depuis, été confirmée (Tian et al, 2003).

Les premières études de profils d'expression génique dans le myélome ont permis de valider les méthodes de purification des plasmocytes et d'analyse des puces. Elles ont comparé les profils d'expression génique de plasmocytes malins et de cellules normales (B ou plasmocytes) ou de MGUS. Ces études ont conduit à l'identification de gènes impliqués dans la différenciation des plasmocytes ou dans l'oncogenèse du myélome. Elles ont également démontré que l'hétérogénéité du myélome se traduisait par des différences de signature d'expression permettant d'identifier des sous-groupes de myélomes. A ce stade, les études étaient surtout descriptives et n'avaient pas permis de corréler les caractéristiques cliniques, biologiques des myélomes avec les données d'expression.

C'est dans ce contexte que notre première étude a été publiée.

## V.5 Recherche de signature d'expression associées au phénotype.

### V.5.1 ARTICLE 1 : Identification de signatures d'expression associées au phénotype.

Le myélome est une pathologie hétérogène à de multiples niveaux.

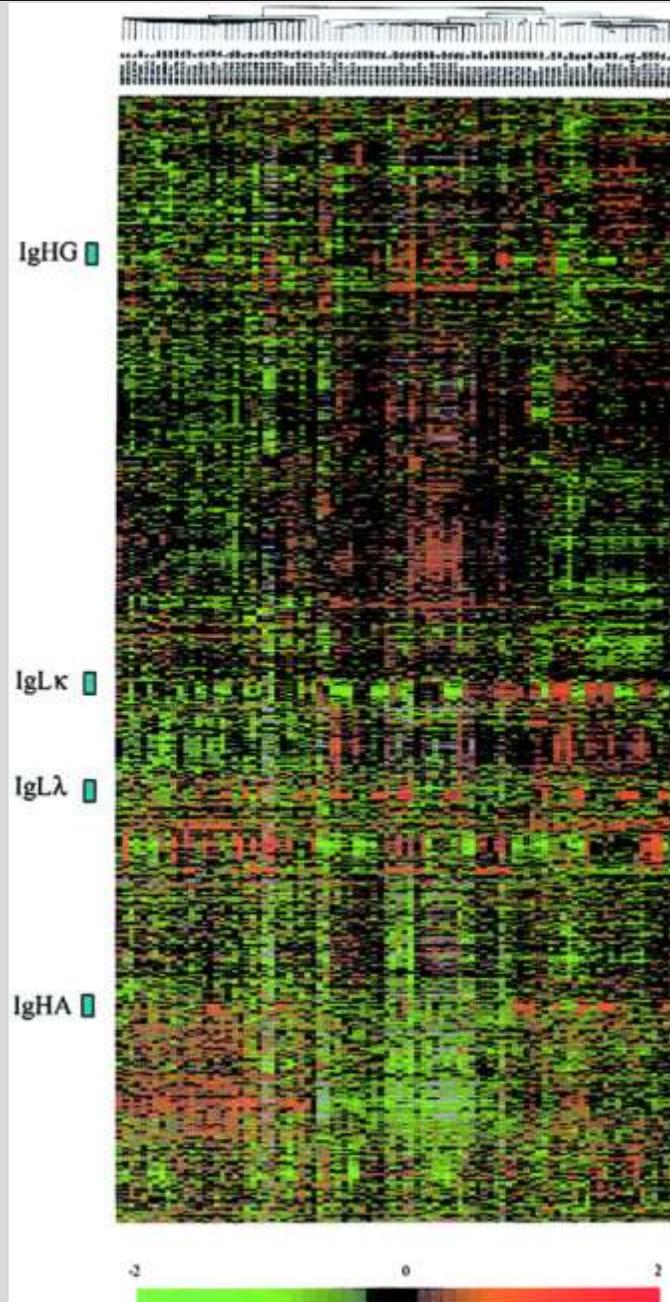
- *Sur le plan biologique*, les myélomes sont caractérisés par la nature du composant monoclonal produit par le clone malin. Plusieurs études ont démontré que la nature de l'isotype a un impact pronostic. Ainsi, les myélomes à IgA sont de moins bon pronostic (Matzner et al, 1978; Desikan et al, 2000; Facon et al, 2001).
- *Sur le plan clinique*, certains patients développent plus de complications et notamment une atteinte osseuse.

Le but de la première étude menée dans l'unité était de rechercher si l'hétérogénéité clinique et biologique du myélome était associée à une hétérogénéité moléculaire. En d'autres termes, notre question était de savoir s'il existait des programmes transcriptionnels corrélés aux entités biocliniques des myélomes.

#### V.5.1.1 Résultats

##### V.5.1.1.1 Corrélation des profils d'expression génique avec l'isotype

Nous avons analysé les profils d'expression génique de plasmocytes médullaires de 92 patients ayant un myélome. L'analyse non supervisée sur la base des niveaux relatifs d'expression des 2 600 gènes significativement exprimés dans au moins 1/3 des patients montrait que les MM ne se répartissaient pas selon les données biocliniques disponibles (isotype du composant monoclonal, taux de  $\beta 2$  microglobuline sérique, délétion du chromosome 13,...). Cependant, parmi les groupes de gènes corrélés, 4 groupes contenant respectivement les gènes codant pour les chaînes lourdes gamma et alpha et les chaînes légères kappa et lambda étaient identifiables. Ces groupes de gènes définissaient des programmes transcriptionnels corrélés aux gènes des chaînes lourdes ou légères des immunoglobulines (figure 13).



**Figure 13 : Regroupement hiérarchique de 92 myélomes.** Les groupes de gènes contenant les gènes des chaînes d'immunoglobulines sont indiqués à gauche.

Pour mieux les caractériser, nous avons effectué une analyse supervisée comparant les profils d'expression génique des myélomes IgG et IgA. Cette analyse nous a permis d'identifier 58 gènes discriminants entre les myélomes IgA et IgG. Les gènes surexprimés dans les myélomes IgA étaient associés à une inhibition de la différenciation et de l'apoptose. A l'inverse, les gènes sous exprimés dans ce groupe étaient associés à la réponse immunitaire, au contrôle du cycle cellulaire

et à l'apoptose. Ces résultats montraient que les différences d'isotypes s'accompagnent de modifications transcriptionnelles qui paraissent ordonnées et qui dépassent la simple dérégulation des gènes codant pour les chaînes d'immunoglobulines. Pour une meilleure représentation visuelle, une analyse en regroupement hiérarchique a été effectuée en utilisant ces gènes ordonnés selon leur fonction biologique probable. La figure 14 montre que la majorité de gènes sélectionnés sont surexprimés dans les MM IgG (branche de droite du dendrogramme). Les gènes identifiés pourraient permettre de comprendre le caractère pronostic péjoratif de l'isotype IgA.

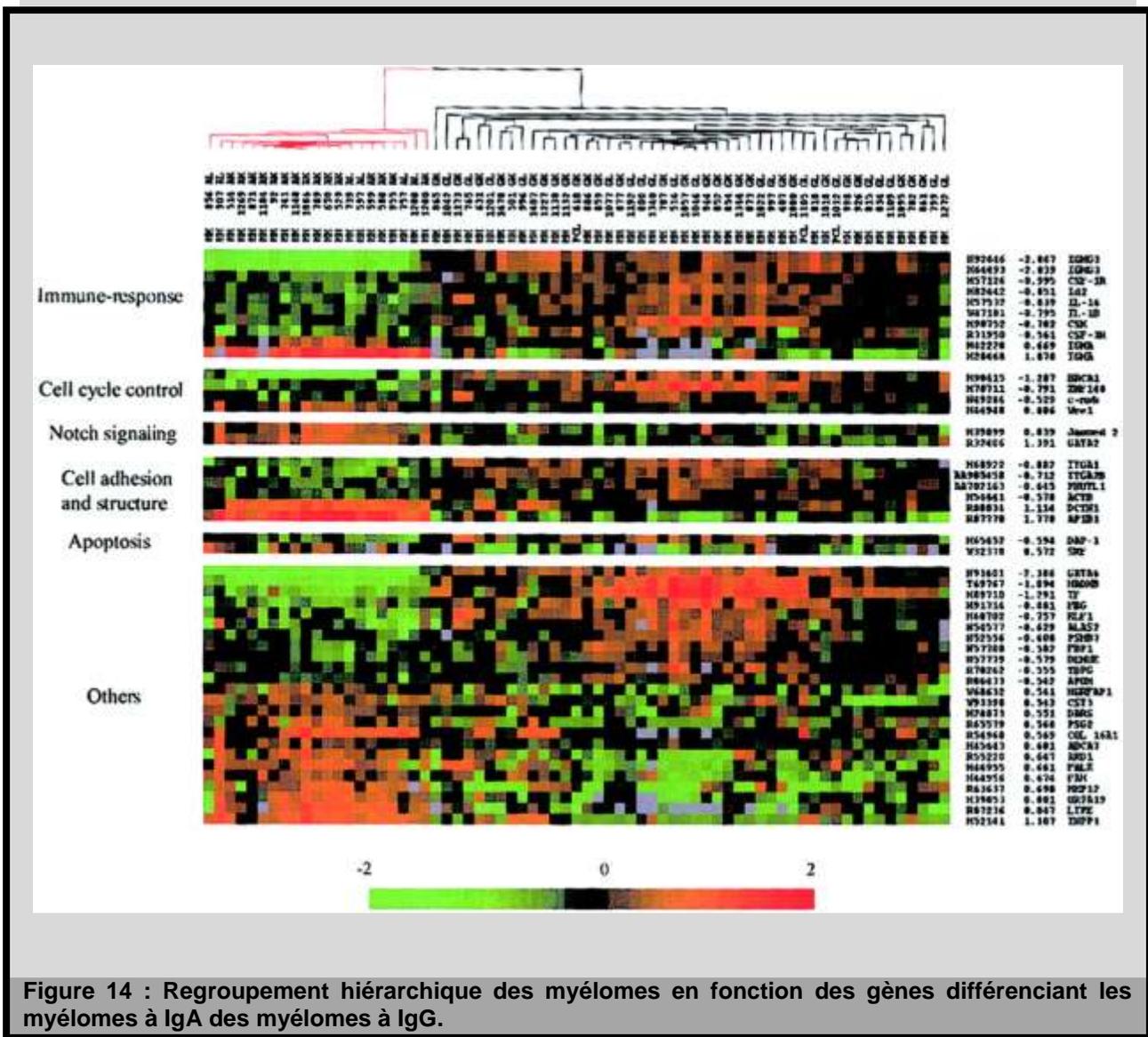


Figure 14 : Regroupement hiérarchique des myélomes en fonction des gènes différenciant les myélomes à IgA des myélomes à IgG.

#### V.5.1.1.2 Corrélation des profils d'expression génique avec l'existence d'une atteinte osseuse

Une analyse supervisée a également été menée pour comparer les myélomes en fonction de l'isotype de la chaîne légère. Nous avons identifié 90 gènes (signature « chaînes légères ») discriminants entre chaînes légères kappa et lambda. L'analyse détaillée a révélé une surexpression de certains gènes essentiels pour le remodelage osseux, principalement l'ostéoclastogenèse, comme Mip-1 $\alpha$  (Choi et al. 2000 ; Choi et al. 2001 ; Choi and Roodman 2001 ; Han et al. 2001 ; Abe et al. 2002) ou BMP2, (Kaneko et al. 2000) dans les myélomes exprimant une chaîne légère kappa.

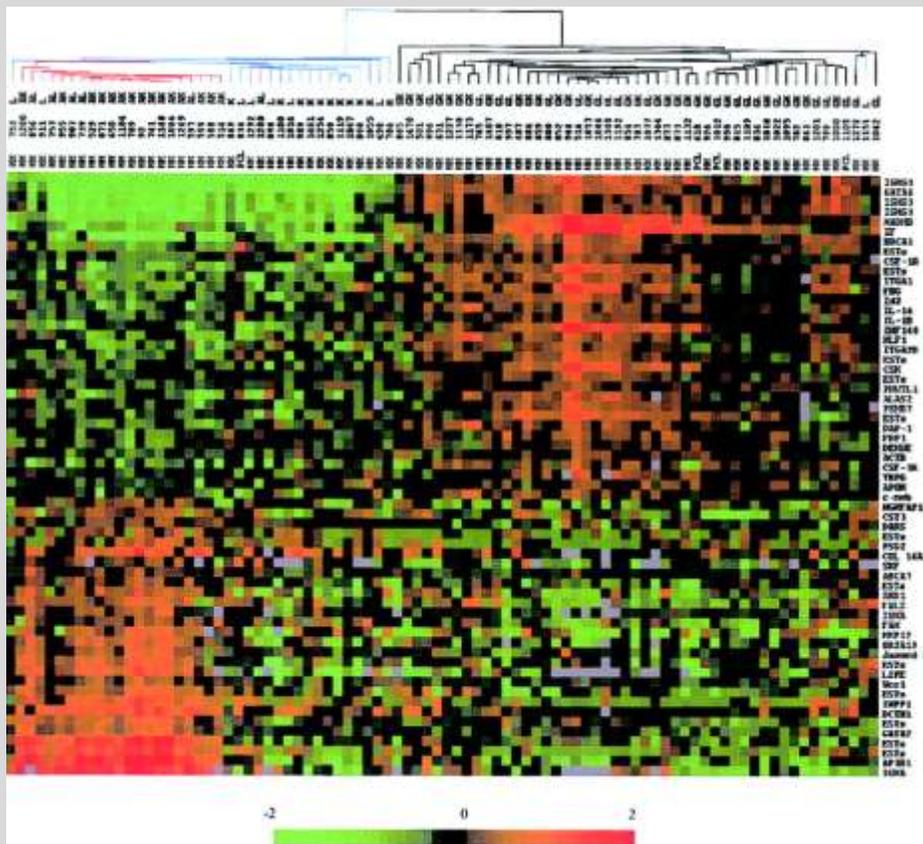


Figure 15 : Regroupement hiérarchique des myélomes en fonction des gènes différenciant les myélomes dont la chaîne légère est kappa des myélomes dont la chaîne légère est lambda.

Ce résultat nous a incités à regarder si ce groupe de 90 gènes pouvait différencier les myélomes avec atteintes osseuses majeures de ceux sans atteintes osseuses. Une analyse non supervisée a



### **V.5.1.2 Commentaires**

Cette étude était la première à montrer, dans le myélome, l'existence de corrélations entre des caractéristiques biocliniques et des signatures d'expression génique. Elle a également permis de fournir une explication quant à la gravité accrue de sous type biologique de myélome (myélome à IgA, myélome dont la chaîne légère est kappa avec atteinte osseuse). Ces résultats ont prouvé que l'étude des profils d'expression génique pouvait être le point de départ de programmes de recherche translationnelle.

En dehors de l'aspect scientifique, cette étude a permis de valider l'approche technique utilisée :

- *Puces académiques* : Les puces utilisées étaient des membranes de nylon sur lesquelles sont déposés des produits de PCR obtenus à partir de 5470 clones d'ADNc. Elles étaient produites dans un laboratoire académique (ERM 206). Les clones d'ADNc avaient été choisis dans une banque pour que les puces soient plus spécifiques des plasmocytes. Notre étude prouvait que cette approche était réalisable avec des coûts moindres que les puces commerciales disponibles à cette date. Par la suite, cette technique a été importée dans l'Unité.
- *Prélèvements multicentriques* : Une des principales difficultés de l'étude des profils d'expression génique est la nécessité d'obtenir un grand nombre d'échantillons de tumeurs ayant une qualité de conservation suffisante pour obtenir des ARN intègres. Les plasmocytes analysés dans notre étude étaient purifiés à partir de prélèvements médullaires effectués chez des patients atteints de myélome et inclus dans un des protocoles thérapeutiques de l'Intergroupe Francophone du Myélome (IFM). Les prélèvements médullaires avaient été effectués dans plusieurs centres investigateurs français puis centralisés dans le laboratoire d'hématologie du CHU de Nantes. La purification des plasmocytes était effectuée à Nantes. Notre étude prouvait donc la faisabilité d'une analyse des profils d'expression génique à partir de prélèvements obtenus en multicentrique. A notre connaissance, il s'agissait de la première étude de génomique menée à partir de prélèvements obtenus en multicentrique.

# **COPIE DE L'ARTICLE 1**

## Gene expression profiling of multiple myeloma reveals molecular portraits in relation to the pathogenesis of the disease

Florence Magrangeas, Valéry Nasser, Hervé Avet-Loiseau, Béatrice Loriod, Olivier Decaux, Samuel Granjeaud, François Bertucci, Daniel Birbaum, Catherine Nguyen, Jean-Luc Harousseau, Régis Bataille, Rémi Houlgatte, and Stéphane Minvielle

Although multiple myeloma (MM) is a unique entity, a marked heterogeneity is actually observed among the patients, which has been first related to immunoglobulin (Ig) types and light chain subtypes and more recently to chromosomal abnormalities. To further investigate this genetic heterogeneity, we analyzed gene expression profiles of 92 primary tumors according to their Ig types and light chain subtypes with DNA microarrays. Several clusters of genes involved in various biologic functions such as immune response, cell cycle control, signaling, apoptosis, cell adhesion, and structure significantly discriminated IgA- from IgG-

MM. Genes associated with inhibition of differentiation and apoptosis induction were up-regulated while genes associated with immune response, cell cycle control, and apoptosis were down-regulated in IgA-MM. According to the expression of the 61 most discriminating genes, BJ-MM represented a separate subgroup that did not express either the genes characteristic of IgG-MM or those of IgA-MM at a high level. This suggests that transcriptional programs associated to the switch could be maintained up to plasma cell differentiation. Several genes whose products are known to stimulate bone remodeling discriminate between  $\kappa$ - and

$\lambda$ -MM. One of these genes, *Mip-1 $\alpha$* , was overexpressed in the  $\kappa$  subgroup. In addition, we established a strong association ( $P = .0001$ ) between  $\kappa$  subgroup expressing high levels of *Mip-1 $\alpha$*  and active myeloma bone disease. This study shows that DNA microarrays enable us to perform a molecular dissection of the bioclinical diversity of MM and provide new molecular tools to investigate the pathogenesis of malignant plasma cells. (Blood. 2003;101:4998-5006)

© 2003 by The American Society of Hematology

### Introduction

Multiple myeloma (MM) is characterized by the accumulation of malignant plasma cells (PCs), usually within the bone marrow. Besides the demonstration of this excess of PCs, the diagnosis of MM is usually supported by the finding of lytic bone lesions on x-rays and the presence of a monoclonal immunoglobulin (Ig) in the serum and/or urine. The monoclonal Ig allows us to define several types of MM, depending on the Ig heavy chain (IgH) isotype and light chain subtype (IgL). Most MMs are characterized by the excretion of a complete monoclonal Ig, easily detectable on the serum electrophoresis. The most frequent Ig is IgG (about 60% of the patients), followed by IgA (about 25%). In a few cases, other Ig classes are observed—that is, IgD, IgM, or IgE (less than 2% of the patients). In other instances, malignant PCs do not excrete any Ig chain, representing about 1% of the patients. Finally, approximately 15% of the patients excrete only light chains; the so-called Bence Jones MM (BJ-MM). Apart from these IgH characteristics, the M component may be further classified upon the light chain subtype—that is, either the  $\kappa$  chain or the  $\lambda$  chain. Roughly two thirds of the patients present a  $\kappa$ -type MM and one third a  $\lambda$ -type MM, a proportion similar to that observed in normal PCs. These light chains are often produced in excess, and even in common IgG- or IgA-MM, free light chains are detected in the serum and/or urine.

Of note, these different Ig types and light chain subtypes have been associated with specific clinical or biologic presenting features, such as bone involvement and renal impairment, and with different clinical outcome.<sup>1</sup> However, so far, no published study has addressed the question of possible different biologic behaviors in these different types of MMs—that is, IgG- versus IgA-MM, IgG- and IgA-MM versus BJ-MM, or  $\kappa$ -type versus  $\lambda$ -type MM. The recent development of the microarray technology has opened new windows on the way to approach specific intracellular biologic pathways<sup>2,3</sup> and to improve tumor classifications.<sup>4,5</sup> To address this issue, we have analyzed a large series of patients with MM using gene expression profiling, focusing our analysis on the differences in gene activation (or repression) associated with the different Ig types—that is, IgG versus IgA, and  $\kappa$  light chain versus  $\lambda$  light chain subtypes.

### Patients, materials, and methods

#### Patients

The diagnosis of MM was done according to the criteria of the Southwest Oncology Group.<sup>10</sup> From a total of 105 patients analyzed in the present study, high-quality gene expression data were obtained on 88 MMs and 4

From INSERM U463, Department of Clinical Hematology, University Hospital, Nantes, France; INSERM ERM206; and INSERM U119, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France.

Submitted November 7, 2002; accepted February 15, 2003. Prepublished online as Blood First Edition Paper, March 8, 2003. DOI 10.1182/blood-2002-11-3385.

Supported by grants from the International Myeloma Foundation and from the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe labellisée 2001 et Programme Carte d'Identité des Tumeurs).

S.M. and R.H. equally supervised this work.

Reprints: Stéphane Minvielle, INSERM U463, Institut de Biologie, 9 Quai Moncousu, 44095 Nantes Cedex 1, France; e-mail: sminviel@nantes.inserm.fr; and Rémi Houlgatte, ERM206 INSERM, Parc Scientifique de Luminy, case 900, 13268 Marseille Cedex 9, France; e-mail: houlgatte@tagc.univ-mrs.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2003 by The American Society of Hematology

primary cell leukemia (PCLs) defined by more than 20% of malignant PCs in the peripheral blood. Newly diagnosed untreated patients were referred to one of the clinical centers of the Intergroupe Francophone du Myelome (IFM). Written informed consent was obtained from all the patients according to the Declaration of Helsinki. The median age of the patients was 60 years (range, 31-78 years). The clinical staging was established according to standard criteria of Durie and Salmon<sup>21</sup>: 14 stage I, 7 stage II, 67 stage III, and 4 PCL. The monoclonal Ig was IgGκ in 28 patients, IgGλ in 22 patients, IgAκ in 16 patients, IgAλ in 6 patients, BIPκ in 12 patients, and BIPλ in 8 patients. Correlations of the 2 strongest prognostic factors, β<sub>2</sub>-microglobulin (β<sub>2</sub>M) and chromosome 13 abnormalities, across the isotypes and subtypes subgroups were analyzed. Serum β<sub>2</sub>M levels and chromosome 13 deletions (fluorescent in situ hybridization analysis) were not significantly different among these MM subgroups.

#### PC purification and total RNA isolation

Mononuclear bone marrow cells were separated using gradient density centrifugation (lymphocyte separation medium, Eurobio, Les Ulis, France), and plasmacytosis was evaluated by morphology in these mononuclear cell suspensions. PCs were then positively selected using anti-CD138-coated microbeads (Miltenyi, Paris, France), because CD138 is expressed only on PCs (normal and malignant) within the bone marrow. Purity and viability of the positively selected cell suspension was assessed by morphology and was above 96% in all the cases. One million PCs were used to prepare total RNA using the guanidinium thiocyanate-phenol method.<sup>17</sup> The RNA integrity was randomly verified by using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA). Half the preparation was used to generate a complex probe.

#### Gene expression profiling procedures

**Vector oligomer labeling and hybridization conditions.** One microgram of vector oligonucleotide was labeled at the 5' end with 30 μCi (1.11 MBq) [<sup>32</sup>P]adenosine triphosphate ([<sup>32</sup>P]ATP) and 10 units of T4 polynucleotide kinase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for 45 minutes at 37°C; unincorporated nucleotides were removed by purification on a Sephadex G-25 column (Roche, Meylan, France). The vector oligonucleotide sequence used was 5'-ACTGGCCGTCGTTTACA. Nylon microarrays were prehybridized in hybridization mix (5 × SSC, 5 × Denhardt solution, 0.5% sodium dodecyl sulfate [SDS]) for 4 hours at 42°C and then hybridized with the vector probe for 2 hours at 42°C. After hybridization, filters were washed in 2 × SSC, 0.1% SDS at room temperature for 10 minutes and at 42°C for 5 minutes. After phosphor screen acquisition (Fuji BAS 5000; Fuji, Tokyo, Japan), filters were stripped in 0.1 × SSC, 0.1% SDS at 68°C for 3 hours before hybridization with a complex probe. Quantification of the vector probe hybridization signal provided a value corresponding to the amount of DNA fixed in each spot of the microarray.

**Preparation and labeling of complex probes from total RNA and hybridization conditions.** Aliquots of 2.5 μg total RNA, 8 μg oligo(dT)<sub>25</sub> to saturate long polyA tails, and 0.3 ng in vitro-synthesized *Arabidopsis thaliana* cytochrome c554 allowing interfilter normalization were mixed, heated to 70°C for 8 minutes, and cooled to 42°C before reverse transcription in a reaction mixture containing 50 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane)-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 10 mM dithiothreitol (DTT), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 units RNase inhibitor (GIBCO BRL, Cergy Pontoise, France), 0.4 mM each of deoxyuridine triphosphate (dATP), deoxyguanosine triphosphate (dGTP), and deoxythymidine triphosphate (dTTP), 240 mM deoxycytidine triphosphate (dCTP), 30 μCi (1.11 MBq) [<sup>32</sup>P]dCTP, and 400 units Superscript RNAse H reverse transcriptase (GIBCO BRL) for 2 hours at 42°C. After alkali treatment and neutralization, unincorporated nucleotides were removed by purification on a Sephadex G-50 column (Roche). The complex probe was then incubated for 2 hours at 65°C with 2 μg poly(dA)<sub>60</sub> to eliminate spurious hybridization via the polyA tail present in some clones before hybridization. Nylon microarrays were prehybridized in 1 mL hybridization mix for 6 hours at 68°C and then hybridized with the complex probe in 0.4 mL hybridization mix for 48 hours at 68°C. After hybridization, filters were washed twice in 0.1 × SSC, 0.1% SDS at 68°C for 90 minutes.

**Nylon microarray technology.** The feasibility, reproducibility, and sensitivity of spotting procedures onto nylon membrane currently used in our laboratory to produce cDNA arrays have been previously described.<sup>13-16</sup>

All cDNA clones were chosen using the expressed sequence tag (EST) database from the NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. The clones were selected from libraries constructed with cloning vectors pTTT3D or Ladin BA, same host bacteria, and an insert size of approximately 1 kb. Clones were provided by the Human Genome Mapping Project Resource Centre (Hinxton, United Kingdom). From our 7200 cDNA library, preferentially composed of genes expressed in carcinogenesis and immune response, we used 5376 cDNA clones to design our nylon microarrays. The selection of these clones was based on preliminary DNA microarray expression data obtained with a cDNA probe prepared from a pool of total RNA isolated from 4 different MM cell lines and 2 MM patients hybridized to a microarray containing 7200 cDNAs.

The cDNA clones were amplified in 96-well microtiter plates with 5'-GTGGAATTGTGAGCGGATAAC and 5'-GCAAGGCCGATTAAGTTGGG. Polymerase chain reaction (PCR) products with more than one band or with an unexpected size were rejected. PCR product concentration was adjusted to 0.3 μg/μL. PCR products were spotted onto Hybond N+ filter (Amersham, Orsay, France) using GMS 417 arrayer. DNA spotted was then denatured and UV-cross-linked onto nylon filter. All membranes contained a set of control spots. The pTTT3D vector, poly(dA)<sub>60</sub>, vector oligonucleotide, and 50 PCR reactions without template were used as negative controls. Many genes were spotted in duplicate spots to assess the reproducibility. *Arabidopsis thaliana* cytochrome c554 clone that is devoid of similarities to human DNA sequences is used to normalize the differences in labeling of each complex probe.

The reproducibility of complex probe hybridization was verified first by analyzing a variation in average intensity difference. Up to 3% of the clones showed a 2-fold difference in signal intensity.<sup>13</sup> Secondly, we compared 2 microarrays hybridized with complex probes prepared with 2 RNA samples extracted separately from the same patient. The samples were always found clustered in directly adjacent columns. We have demonstrated previously that the hybridization signal is proportional to the abundance of individual species in the complex probe and to the amount of PCR products spotted onto the microarray. In our hybridization conditions the minimum sample for detection is  $0.2 \times 10^6$  molecules. In addition, the amount of PCR products per spot being 1500 times more than the detection limit, the signal measured for highly expressed genes is not saturated.

**Sample quality standard.** In this study we obtained high-quality gene expression data on 92 of 105 samples (88%). The quality is estimated by measuring the signal intensity of all clones in a microarray and the number of spots detected; if these 2 parameters are too low the microarray is not considered for the study.

**Data acquisition and normalization.** DNA microarrays were scanned at 25-μm resolution in an image plate system (Fuji BAS 5000; Fuji). The hybridization signals were quantified using ArrayGauge software v.1.3 (Fuji). A background value for each membrane hybridization was calculated from negative controls and subtracted to each expression value. The data were corrected for the amount of PCR product detected by the vector probe and normalized using *Arabidopsis thaliana* cytochrome c554 control clone. Sets of genes that were not measured on at least 60 of the 92 samples were removed. Statistical analyses were performed using the remaining set of 2600 genes.

#### Statistical analysis

Samples and genes were median centered and log transformed before data analysis. Gene and sample classifications were obtained by unsupervised hierarchical clustering using uncentered correlation distance and average linkage aggregative method with the Cluster and Tree View softwares (M. Eisen, <http://www.microarrays.org/software>).<sup>21</sup>

Gene-discriminating particular subgroups of MM were searched using a signal-to-noise calculation:  $DS = (\mu_1 - \mu_2)/(\sigma_1 + \sigma_2)$ , where  $\mu_1$  and  $\sigma_1$ , respectively, represent mean and standard deviation of the expression levels of the gene in subgroup 1, and  $\mu_2$  and  $\sigma_2$  represent mean and standard deviation of the same gene in subgroup 2.<sup>4</sup> A total of 200 random permutations of the samples were used to calculate significance level at

1:10 000 risk, giving less than 1 gene found by chance (false-positive gene). The data sets used for the identification of genes that distinguish Ig subtypes or isotypes are available at our website: <http://tagc.univ-mrs.fr/pub/>.

#### RT-PCR procedures

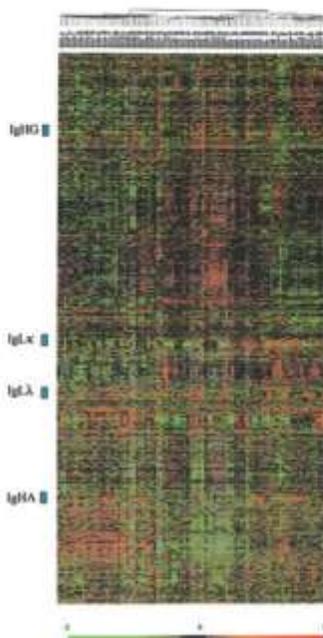
The first cDNA strand was synthesized using total RNA (2.5  $\mu$ g) at 37°C for 1 hour in a 50- $\mu$ L reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 10 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 units RNase inhibitor (GIBCO BRL), 0.5 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 400 units Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase (Gibco), and 0.5  $\mu$ g oligo(dT) 15 mer. Five microliters of the reaction mixture was made up to 50  $\mu$ L using Taq polymerase buffer (10 mM Tris-HCl [pH 9], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) containing 25 pmol of each primer, 1 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), and 1 unit of AmpliTaq DNA polymerase (Amersham). Amplifications were performed using a thermal cycler for 20 cycles under the following conditions: denaturation for 1 minute at 94°C, annealing for 1 minute at 55°C, and elongation for 1 minute at 72°C. *Mip-1 $\alpha$*  was amplified using the following primers: sense primer: 5'-CGAGCCCACTTCCTGTCACC-3' and antisense primer: 5'-CCATGACTGCCTACACAGGC-3'. PCR products were separated in a 1% agarose gel and directly visualized after ethidium-bromide staining. Expression of  $\beta$ -actin using primers 5'-ATCTGGACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3' and antisense 5'-CGTCATACTCCTGCTTCTGATCCACATCTGC-3' was assessed to ensure uniformity of amplification.<sup>18</sup>

#### Results

In this study, we determined the gene expression profiles of 88 newly diagnosed MMs and 4 primary PCLs according to their Ig types and light chain subtypes because M component is the major source of biologic heterogeneity in MM patients.

From highly enriched CD138<sup>+</sup> cells of each tumor sample, 2.5  $\mu$ g total RNA was extracted and used to prepare radioactively labeled cDNA complex targets. Hybridizations were carried out on DNA microarrays containing 5376 genes. Radioactive dot intensities of scanned images were measured and normalized to yield a ratio of background-corrected single-dot intensity to background-corrected median-dot intensity (see "Patients, materials, and methods"). The study was performed using a set of 2600 genes that were significantly expressed across the MM patients. In the initial analysis of the gene expression data, we applied an unsupervised hierarchical clustering algorithm to group the myeloma samples on the basis of similarities in their expression of these genes. The same clustering method was used to group genes on the basis of similarity in their pattern of expression over all the samples. This analysis revealed that the patients were not grouped according to their Ig light chain subtypes or Ig heavy chain isotypes, and genes encoding Ig were found in 4 highly contrasted clusters (Figure 1). We next analyzed gene expression profiles of the patients by using a discriminating score (DS) based on signal-to-ratio calculation<sup>8</sup> to identify and rank the differentially expressed genes among biologic subtypes of MM. The higher score denotes the greater ability to differentiate the 2 MM groups. We used a random permutation test, patients were randomly permuted (200 times) into 2 groups, and for each gene a DS was calculated. A gene significantly distinguishes the 2 groups of patients if it passed a 99.99% significance threshold ( $\alpha$  less than 0.0001).

First, we compared expression data of one subgroup including 45 IgG-MMs and 3 IgG-PCLs with a second subgroup including 21 IgA-MMs. The DS test yielded 61 unique cDNA sequences from 58 different genes whose change in expression among all the patients best distinguished IgG-MM from IgA-MM (Table 1). Hierarchic cluster analysis of the 69 MM samples was performed



**Figure 1.** Hierarchic clustering of 92 diagnostic MM and PCL samples (columns) versus 2600 genes (rows). The normalized expression value for each gene is depicted according to the scale at the bottom; red indicates expression levels greater than the median, and green indicates levels less than the median ( $-2$  to  $2$  in log base 2 units). Gray indicates excluded values.

using expression data of the 61 selected genes; the algorithm perfectly segregated IgG-MM from IgA-MM (data not shown). Figure 2 shows the matrix depicting gene expression values of the MM samples with rows representing characterized genes (49 elements) grouped according to putative biologic functions including immune response, cell cycle control, Notch signaling, cell adhesion and structure, and apoptosis. Most of these genes were up-regulated in IgG-MM versus IgA-MM. The highest differentiating score, except for IgH genes, was found for *GATA6*, a member of the GATA transcription factor family, which has recently been shown to regulate a WNT family member, *WNT7b*.<sup>19</sup> Immune response-associated genes were up-regulated in IgG-MM (eg, the cytokines *IL-1 $\beta$*  and *IL-16*, the cytokine receptors *CSF-1R* and *CSF-3R*, and the B-cell development regulators *Irf2* and *CSK*). Three transcription factors (*BRCAL*, *ZNF148*, *c-myc*) involved in cell cycle control were also up-regulated in IgG-MM, whereas 2 genes involved in Notch signaling in hematopoietic cells (*Jagged2*, *GATA2*) were down-regulated in this subgroup of MM. Among the 6 genes potentially associated with cell adhesion and structure, 2 integrins (*ITGA1* and *ITGA2*) as well as *ACTB* were up-regulated in IgG-MM, whereas *AP1B1* and *DCTN1* were significantly up-regulated in IgA-MM. Only 2 members of the apoptosis class were significantly differentially expressed in these subgroups of MM. The first gene, *DAP-1*, a proapoptotic factor, was overexpressed in IgG-MM, while the second, *SRF*, a regulator of the antiapoptotic molecule *Mcl-1*, was down-regulated in the same subgroup of MM.

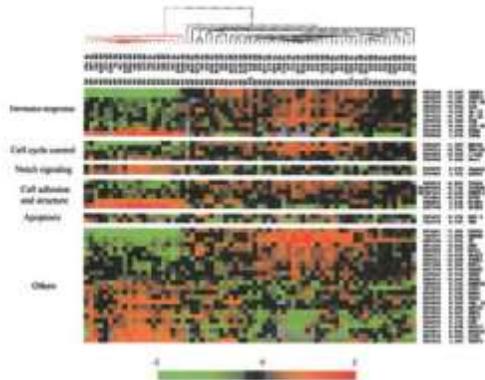
Second, we used the 61 genes that best discriminated IgG- and IgA-MM to investigate whether BJ-MM could represent a distinct group or not. Using hierarchic clustering algorithm, MM samples

**Table 1. Statistically different genes between IgG-MM and IgA-MM**

Gene symbol	Gene description	Accession no.	Discriminating score
IGHG3	IgG	H68233	-2.75
GATA6	GATA-binding protein 6	N91601	-2.39
IGHG3	IgG	NQ2646	-2.07
IGHG3	IgG	H64493	-2.04
HADHB	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, beta subunit	T89767	-1.89
IF	I factor (complement)	H69710	-1.29
BRCA1	Breast cancer 1, early onset	H90415	-1.29
ESTs	Unknown	W48567	-1.10
CSF-1R	Colony-stimulating factor 1 receptor, v-fms oncogene homolog	H57126	-1.00
ESTs	Unknown	H93533	-0.98
ITGA1	Integrin, alpha 1	H68922	-0.88
FBG	Fibrinogen, B beta polypeptide	H01714	-0.88
Id2	Inhibitor of DNA binding 2, dominant-negative helix-loop-helix	H82442	-0.85
IL-16	Interleukin-16 (lymphocyte chemoattractant factor)	H57532	-0.84
IL-1B	Interleukin-1, beta	W47101	-0.80
ZNF148	Zinc finger protein 148 (p4Z-52)	H70711	-0.79
KLF1	Kruppel-like factor 1 (erythroid)	H60702	-0.79
ITGA2B	Integrin, alpha 2b (antigen: CD41B)	AA905458	-0.71
ESTs	Unknown	AA279804	-0.71
CSK	c-src tyrosine kinase	H60752	-0.70
ESTs	Unknown	H22578	-0.70
PHUTL1	Peanut ( <i>Drosophila</i> )-like 1	AA702163	-0.66
ALAS2	Aminolevulinic acid, delta-, synthase 2	N54577	-0.63
PSMB7	Proteasome subunit, beta type, 7 (large multifunctional protease 7)	N52586	-0.61
ESTs	Unknown	N52646	-0.61
DAP-1	Death-associated protein 1	H65452	-0.59
FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	N57708	-0.58
DEHUE	Glutamate dehydrogenase	N57779	-0.58
ACTB	Actin beta	H54441	-0.58
CSF-3R	CSF3R, colony-stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	R31960	-0.56
TBPG	Trophoblast glycoprotein	R70262	-0.56
APOH	Apolipoprotein H	R06433	-0.54
MYB	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog	N49294	-0.53
NGRFAP1	Nerve growth factor receptor (TNFRSF 16)-associated protein 1	W60032	0.54
CST3	Cystatin C	W93399	0.54
DARS	Asparlyl t-RNA synthetase	H28673	0.55
ESTs	Unknown	AA828888	0.56
PSG2	Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 2	R65579	0.57
COL16A1	Collagen type XVI alpha 1	R54968	0.57
SRF	Serum response factor (c-fos SRE-binding transcription factor)	W32378	0.57
ABCA7	ATP-binding cassette, subfamily A, member 7	H45443	0.60
ESTs	Unknown	H51280	0.61
ARD1	N acetyltransferase	R55220	0.65
FALZ	Fetal Alzheimer antigen	H44965	0.66
IGHA	IgA	H42228	0.67
FAH	Fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)	H44966	0.67
MMP12	Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	R63637	0.70
OR2A19	Olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 19	H39853	0.80
JAG2	Jagged2	H39899	0.84
ESTs	Unknown	H43142	0.84
LIPF	Lipase, hormone sensitive	R87236	0.85
WEE1	Wee 1 like	H44948	0.89
ESTs	Unknown	H29761	0.97
INPP1	Inositol polyphosphate-1-phosphatase	H52141	1.11
DCTN1	Dynactin 1	R88834	1.11
ESTs	Unknown	AQ201426	1.13
GATA2	GATA-binding protein 2	R32406	1.39
ESTs	Unknown	H28469	1.65
ESTs	Unknown	H43035	1.72
AP1B1	Adaptor-related protein complex 1, beta 1 subunit	R87770	1.79

were organized on the basis of overall resemblance in their gene expression patterns restricted to these genes (Figure 3). The measure of these similarities was provided by a dendrogram that clearly separated the 3 subgroups of MM. The colored gene

expression matrix showed that IgA and IgG transcripts were absent in most of the BJ-MMs, indicating that the lack of IgH protein synthesis observed in these patients was due to either abnormalities at the DNA level or RNA level. A recent study combining Southern



**Figure 2.** Hierarchical clustering of IgH-secreting MM based on the identified genes (49 members) that best distinguished IgG-MM from IgA-MM. Red-colored branches represent IgA-MM, and black branches represent IgG-MM. Genes were grouped in potential functional categories. Each column represents an MM sample, and each row represents an individual gene. A pseudocolor representation of gene expression is shown according to the scale at the bottom; red indicates expression levels greater than the median, and green indicates levels less than the median. Gene accession numbers, discriminating scores, and gene symbols are labeled on the right. Gray indicates excluded values.

blot and PCR analysis demonstrated that defects at the DNA level are responsible for the lack of IgH protein production in at least 75% of the BJ-MMs studied.<sup>20</sup> Given that 17 of 19 BJ-MM patients we examined have illegitimate rearrangements of the IgH gene (data not shown), our results are also in favor of DNA defects as a major cause of failure to synthesize IgH proteins. Expression level of the other discriminating genes appeared to be globally diminished in almost all BJ-MMs (see colored matrix in Figure 2).

Third, to determine whether IgL subtypes could be phenotypically different, we used discriminating score methods to compare gene expression profiles of 73 patients (13 stage I, 7 stage II, 49 stage III, and 4 PCL). Statistical analysis identified 80 different genes ( $P < .0001$ ) between Igλ- and Igκ-MM (Table 2). As expected, the top-ranked discriminatory genes were Igλ and Igκ. Detailed analysis revealed the presence of several genes essential for bone remodeling, mainly osteoclastogenesis, that were up-regulated in Igκ-MM: *Mip-1α*, *TGFβ3*, and *BMP2*. Conversely, one gene corresponding to a protein that negatively regulates TGFβ activity (*LTBP4*) was overexpressed in Igλ-MM cases.

Because we found several factors known to stimulate osteoclast formation, we wanted to determine whether we could distinguish MM with an increased osteoclast activity from the others. Among the 73 patients previously analyzed, we selected patients with high myeloma cell mass and known score of bone lesions (49 stage III and 4 PCL) and applied hierarchical clustering algorithm according to their expression of the 80 genes that significantly discriminated between Igκ-MM and Igλ-MM. The sample dendrogram distinguished 2 branches (Figure 4A): the left branch grouped 16 of the 21 MMs showing absence or limited lesions (ie, score 0, 1, or 2 according to Durie and Salmon<sup>11</sup> staging system), and the right branch captured 28 of the 32 MMs having multiple bone lesions (ie, score 3 according to Durie and Salmon staging system). Thus, the IgL signature clearly separated MM presenting aggressive bone destruction from the others ( $\chi^2$  test,  $P < .001$ ). This gene signature was then tested in a new group of 19 patients (validation group) with stage III MM (6 Igλ-MM and 13 Igκ-MM). The dendrogram (Figure 4B) assigned 5 of 7 MMs without bone disease on the left branch and 11 of 12 MMs with bone disease on the right branch

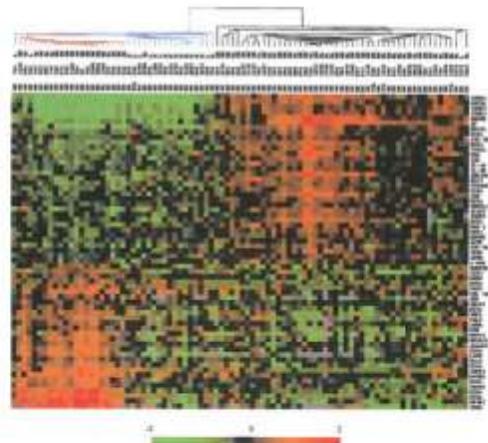
( $P < .001$ ). This result validates the relationship between bone disease and light chain cluster.

In addition, *Mip-1α* gene expression data obtained with DNA microarray experiments were confirmed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis (Figure 4C). Interestingly, *IL-1β*, another factor involved in the increase of osteoclast formation and bone destruction in MM,<sup>21</sup> is differentially expressed according to Ig isotype but not according to Ig light chain subtype, supporting the view that IL-1β protein could not be produced by malignant PCs as previously emphasized.<sup>22-24</sup>

## Discussion

Gene expression profiling represents a novel molecular approach to examine MM pathogenesis. Using this technology, we addressed questions regarding the marked heterogeneity of MM: do different biologic phenotypes explain divergent clinical courses? Expression profiles of highly purified malignant PCs from 88 MM and 4 PCL patients revealed that specific transcriptional programs are associated with the Ig types and light chain subtypes. Careful analysis of the differentially expressed genes revealed molecular portraits related to disease presentation.

The most discriminating gene between IgG- and IgA-MM, apart from IgH genes, is the transcription factor GATA6, which belongs to the GATA zinc finger family and plays an important role in lung epithelium development.<sup>25</sup> Recently it has been demonstrated that GATA6 regulates WNT7B,<sup>19</sup> a member of the WNT family that is up-regulated in malignant breast tissue<sup>26</sup> and in bladder tumors.<sup>27</sup> Several members of the WNT signaling pathway (WNT5A, WNT10B, FRZB) have been shown to be deregulated in MM.<sup>28,29</sup> Given the key role played by the WNT signaling pathway in carcinogenesis and embryology,<sup>30,31</sup> we can hypothesize that overexpression of these growth factors in MM may play a role in the pathogenesis of MM.

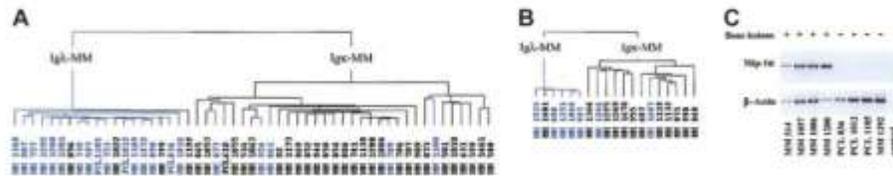


**Figure 3.** Dendrogram and color matrix representing the hierarchical clustering of the 88 myeloma samples versus 61 genes. The genes used in this analysis were chosen by a discriminating score statistic that is most highly correlated with the 2 IgH isotypes. Blue-colored branches represent BJ-MM, red branches represent IgA-MM, and black branches represent IgG-MM. Columns represent individual MM samples, and rows represent individual genes on the microarray. A pseudocolor representation of gene expression is shown according to the scale at the bottom; red indicates expression levels greater than the median, and green indicates levels less than the median. Gray indicates excluded values.

**Table 2. Statistically different genes between I $\lambda$ -MM and I $\mu$ -MM**

Gene symbol	Gene description	Accession no.	Discriminating score
I $\lambda$ @	Ig lambda	H14824	-2.74
ESTs	Unknown	H26076	-2.56
ESTs	Unknown	H26661	-1.94
I $\lambda$ @	Ig lambda	R63196	-1.81
ESTs	Unknown	H15899	-1.80
CDSN	Corneodesmosin	V95594	-1.77
MCP	Membrane cofactor protein (CD46)	H26673	-1.66
ESTs	Unknown	R83001	-1.63
I $\lambda$ @	Ig lambda	H15030	-1.82
ESTs	Unknown	R74030	-1.33
ABCD4	ATP-binding cassette, subfamily D, member 4	H51632	-1.22
SAMHD1	SAM domain and HD domain, 1	H47862	-1.07
LTFP4*	Latent transforming growth factor-beta-binding protein 4	R73631	-1.02
ESTs	Unknown	R91051	-1.02
ESTs	Unknown	R89772	-0.99
LMNA	LaminA/C	H26659	-0.98
I $\lambda$ @	Ig lambda	H41911	-0.95
ESTs	Unknown	R16095	-0.91
ZNF361	Zinc finger protein 361	R73795	-0.90
LTA	Lymphotxin-alpha	AA910185	-0.91
RPL4	Ribosomal protein L4	N35801	-0.77
ESTs	Unknown	N35710	-0.86
FMG5	Flavin-containing monooxygenase 5	H51750	-0.65
ESTs	Unknown	R72642	-0.64
MX1	Max-interacting protein 1	AA115514	-0.63
SCN1B	Sodium channel, voltage-gated, type 1, beta subunit	R74526	-0.61
ARHG	Ras homolog gene family, member G	H45512	-0.58
NTE	Neuropathy target esterase	H09751	-0.57
HVEB	Herpesvirus entry mediator B	R73625	-0.56
AXL	AXL receptor tyrosine kinase	H09737	-0.52
GAR22	GAS2-related on chromosome 22	R72509	-0.51
PBX1	Pre-B-cell leukemia transcription factor 1	AA403031	-0.51
HYAL1	Hyaluronoglucosaminidase 1	V94634	-0.50
PRKC1	Protein kinase C, zeta form	AA082633	0.50
PLXNB3	Plaxin B 3	R41456	0.50
CTSB	Cathepsin B	H96635	0.51
CSNK2A2	Casein kinase II, alpha-2	AA099405	0.53
MMP12	Matrix metalloproteinase 12	R63637	0.54
ACK1	Human activated p21cdc42Hs kinase	R44803	0.54
ESTs	Unknown	AA883516	0.55
EDN3	Endothelin 3	AA553611	0.58
ESTs	Unknown	V74500	0.59
CUL4A	Cullin 4A	AA100050	0.59
DDR1	Discoidin domain receptor family, member 1	AA574033	0.60
Mip-1a*	Macrophage inflammatory protein 1-alpha (SCYA5)	W74298	0.64
ESTs	Unknown	T66845	0.64
NRAD1	Nuclear receptor subfamily 1, group D	R85515	0.66
UBE4A	Ubiquitin ligase factor E4A	R45238	0.66
FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral oncogene homolog	V91586	0.66
SIAM2	Seven in absentia, drosophila, homolog of 2	R61685	0.68
ESTs	Unknown	AA548364	0.71
TGF $\beta$ 3*	Transforming growth factor, beta-3	V90655	0.73
ZNF198	Zinc finger protein 198	N71855	0.81
TJP2	Tight junction protein 2 (zona occludens 2)	H05082	0.82
CEP3	cdc42 effector protein 3	R43949	0.86
ESTs	Unknown	H89735	0.87
GSTM5	Glutathione S-transferase, mu-5	R40442	0.89
ESTs	Unknown	N58796	0.91
IGKC	Ig kappa	AA294639	0.92
UBE3A	Ubiquitin-protein ligase E3A	AA126762	0.97
DSG1	Desmoglein 1	V772927	0.97
RECQL5	RECQ protein-like 5	R32075	1.04
BPHL	Biphenyl hydrolase-like	AA157197	1.04
ELAVL4	Embryonic lethal, abnormal vision, drosophila, homolog-like 4	R55730	1.06
TNFRSF6	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6 (CD95)	AA031300	1.06
NR2C1	Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1	H66838	1.10
SMARCA1	Actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 1	AA057875	1.12
NFE2L3	Nuclear factor erythroid 2-like 3	R43198	1.17
CYB5	Methemoglobinemia due to deficiency of cytochrome b5	N23249	1.19
LAMB3	Laminin, beta-3	AA622206	1.19
SH3GL2	SH3 domain, GRB2-like 2 (endophilin 1)	R20729	1.20
HSD17B2	17- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase II	N23665	1.30
BMP2*	Bone morphogenetic protein 2	AA114112	1.34
PRKCABP	PRKCA-binding protein	AA041722	1.54
HOX11	Homeobox 11	AA007444	1.61
ESTs	Unknown	N30860	1.66
ESTs	Unknown	AA826328	1.69
EXT1	Exostosin, multiple, type 1	R13402	1.70
ESTs	Unknown	V92915	1.79
IGKC	Ig kappa	R71916	1.82

\*Genes known to be involved in bone remodeling.



**Figure 4.** Dendrogram representing the hierarchic clustering of MM patients in stage III and PCL with known bone lesions; score based on the genes of Igk expression signature. (A) Hierarchic tree of 53 MMs (preliminary group). (B) Hierarchic tree of 10 MMs (validation group). Blue-colored branches represent MMs showing absence or limited bone lesions, black branches represent MMs displaying multiple bone lesions. (C) RT-PCR experiments showing *Mip-1 $\alpha$*  mRNA expression in 8 patients, labeled (+) for multiple bone lesions or (-) for absence of or limited bone lesions. Control indicates no template in the PCR reaction.

Analysis of genes included in the immune response cluster is of particular interest. One of the most discriminating genes is *Id2*, a member of the Id class of the helix-loop-helix proteins. Id proteins can act as negative regulators of the class I helix-loop-helix proteins (E proteins), which are known to play a crucial role in lymphocyte development and activity.<sup>32,33</sup> Furthermore, ectopic expression of Id3 in mature activated B cells interferes with IgA expression.<sup>34</sup> These data are in agreement with our results that showed a relative underexpression of *Id2* in IgA-MM. Because the ratio of E proteins to Id proteins appears to be important for later stages of B-cell development, it is important to determine their respective expression in MM. Another gene of interest in this cluster is *IL-16*. Our DNA microarray data showed that *IL-16* was up-regulated in IgG-MM patients. Its expression in purified myeloma cells has been recently reported.<sup>35</sup> *IL-16* has been previously described in a variety of cells including CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells, dendritic cells, and CD19<sup>+</sup> B cells.<sup>36,37</sup> *IL-16* is a ligand of CD4 and induces in vitro chemotaxis of CD4<sup>+</sup> T cells,<sup>38</sup> and CD4 dendritic cells,<sup>39</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>39</sup> Furthermore, *IL-16* markedly inhibits CD3-induced T-cell activation, but this effect is limited to CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>40</sup> Recently, Koike et al<sup>41</sup> have shown that *IL-16* serum level of stage III MM was significantly higher than that of normal controls. In addition, the authors found a correlation between *IL-16* levels and CD4/CD8 ratio. Taken together, these observations suggest that malignant PCs could be a source of *IL-16* and that deregulated expression of *IL-16* could contribute to change of the T-cell phenotype in this disease.<sup>42,43</sup>

Among the 3 cell cycle regulators (*c-myc*, *BRCAl*, and *ZNF148/ZBP-39*) overexpressed in IgG-MM, 2 of them, *BRCAl* and *ZNF148*, have been shown to bind to the C terminus of p53 and stabilized specifically the wild-type form.<sup>44-46</sup> Furthermore, overexpression of *ZNF148* induced growth arrest and apoptosis.<sup>44</sup> It may be highly interesting to investigate the functional role of *BRCAl* and *ZNF148* in the pathogenesis of MM. We can speculate that accumulation of wild-type p53 in malignant PCs could increase efficacy to radiotherapy and chemotherapy, explaining in part the better prognosis of IgG-MM compared with IgA-MM.<sup>47,48</sup>

Two genes involved in Notch signaling are overexpressed in IgA-MM samples compared with IgG-MM samples, *GATA2* and *Jagged2*. Maintenance of *GATA2* expression is necessary for Notch signaling in hematopoietic cells.<sup>49</sup> *Jagged2*, the ligand for Notch1,<sup>50</sup> was previously found to be up-regulated in MM cell lines as compared with EBV (Epstein-Barr virus)-immortalized polyclonal B cells derived from the same patient.<sup>50</sup> Because Notch signaling is known to inhibit differentiation of hematopoietic cells,<sup>51</sup> overexpression of *GATA2* and *Jagged2* could favor the maintenance of malignant immature cells in IgA-MM. Another gene overexpressed in IgA-MM, *SRF*, is of interest because it regulates an antiapoptotic member of the Bcl-2 family, *Mcl-1*.<sup>52</sup> Very recent results from our laboratory and others demonstrated

that *Mcl-1* is required for the survival of MM cells.<sup>53,54</sup> Conversely, an inducer of apoptosis, *DAP-1*, is down-regulated in the same group of patients. *DAP-1* is a member of the ubiquitin-homology proteins that specifically interact with the death domain of TNF-R1 and induce apoptosis in a variety of cell lines.<sup>55</sup> This deregulated balance between proapoptotic and antiapoptotic molecules (in favor of antiapoptotic signals) may explain, at least in part, the lesser chemosensitivity of IgA-MM.

Our analysis of gene expression data of IgH-MM subtypes revealed that genes associated with inhibition of differentiation and apoptosis were up-regulated in IgA-MM, while genes associated with immune response, cell cycle control, and apoptosis induction were down-regulated in this subgroup of MM. These findings were consistent with previous studies demonstrating that the IgA isotype is significantly associated with a shorter survival.<sup>47,48,56</sup> In addition, the fact that BJ-MM patients have strongly diminished IgA and IgG gene signatures suggests that transcriptional programs related to IgH class switch recombination are maintained up to differentiation of activated B cells into PCs in the bone marrow.

The presence of several genes known to be involved in bone remodeling, mainly *Mip-1 $\alpha$* <sup>24,57-59</sup> but also *TGF $\beta$ 3*,<sup>60-62</sup> *BMP2*,<sup>63</sup> and *LTBP4*,<sup>64</sup> in the cluster of genes differentiating Igk-MM and Ig $\lambda$ -MM (indicated by asterisks in Table 2) led us to focus our analysis on clinical presentation and IgL subtypes. Using the IgL discriminating cluster of genes to classify the MM patients, we found a strong association between patients lacking bone lesions and Ig $\lambda$  subtype. Our results confirmed previous studies showing that (1) almost all osteosclerotic MM, without or with the paraneoplastic syndrome (POEMS [polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, and skin lesions]), are Ig $\lambda$ -MM<sup>65</sup>; (2) patients unable to destroy bones even at the end stage of the disease are osteoblastic MM at the histologic level and are Ig $\lambda$ -MM<sup>66</sup>; and (3) two thirds of Ig $\lambda$ -MMs reach high cell mass at diagnosis without lytic bone involvement in contrast to Igk-MM.<sup>66</sup> Of major interest, our DNA microarray and RT-PCR data revealed a correlation between increase of *Mip-1 $\alpha$*  mRNA and severity of bone destruction associated with Igk subtype. Similarly, very recent results reported by Abe et al<sup>59</sup> showed an increase of *Mip-1 $\alpha$*  secretion in highly purified MM plasma cells compared with normal PCs. Given that *Mip-1 $\alpha$*  induced in vitro osteoclast formation in human bone marrow cultures<sup>58</sup> and that highly purified PCs of MM patients with active bone disease induced bone resorption in vitro,<sup>59</sup> the overall data support the view that *Mip-1 $\alpha$*  plays a major role in vivo in MM-induced bone resorption and that osteolytic activity found in Igk-MM is more likely related to an excessive bone resorption than to a decrease of bone formation. The next step will be the identification of specific transcription factors able to induce *Mip-1 $\alpha$*  expression in Igk-MM rather than in Ig $\lambda$ -MM. Because *Mip-1 $\alpha$*  promoter contains *GATA2* plus *AML-1*

plus C/EBP $\alpha$  regulatory regions,<sup>67</sup> these transcription factors appear as good candidates to regulate Mip-1 $\alpha$  expression in MM.

In conclusion, our attempt to examine heterogeneity of MM by using the DNA microarray approach led us to identify genes whose deregulated expression was associated with the pathogenesis of

MM. In addition, our results provide an explanation for the association between Ig $\kappa$ -MM and bone destruction. The major goal of this global approach is to establish a gene expression-based survival predictor for the newly diagnosed patients included within clinical trials of the Intergroupe Francophone du Myélome.

## References

- Bergsagel DE. Plasma cell myeloma: prognostic factors and criteria of response to therapy. In: Sogaquet MJ, ed. *Cancer Therapy: Prognostic Factors and Criteria of Response*. New York, NY: Raven Press; 1975:73-87.
- Ross DT, Scherf U, Eisen MB, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*. 2000;24:227-235.
- Shaffer AL, Rosenwald A, Hurt EM, et al. Signatures of the immune response. *Immunity*. 2001;15:375-386.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286:531-537.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503-511.
- Bitner M, Metzger P, Chen Y, et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*. 2000;406:536-540.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-752.
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415:530-536.
- Bertucci F, Nasser V, Grangeaud S, et al. Gene expression profiles of poor-prognosis primary breast cancer correlate with survival. *Hum Mol Genet*. 2002;11:663-672.
- Durie BG. Staging and kinetics of multiple myeloma. *Semin Oncol*. 1996;13:300-309.
- Durie BG, 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*. 1975;38:842-854.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-159.
- Nguyen C, Rocha D, Grangeaud S, et al. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics*. 1995;29:207-216.
- Bernard K, Auphan N, Grangeaud S, et al. Multiplex messenger assay: simultaneous, quantitative measurement of expression of many genes in the context of T cell activation. *Nucleic Acids Res*. 1995;24:1435-1442.
- Bertucci F, Van Hulst S, Bernard K, et al. Expression scanning of an array of growth control genes in human tumor cell lines. *Oncogene*. 1999;18:3005-3012.
- Bertucci F, Bernard K, Loriod B, et al. Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum Mol Genet*. 1999;8:1715-1722.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14863-14868.
- Magrangeas F, Boisleau C, Denis S, Jacques Y, Minvielle S. Negative regulation of oncostatin M signaling by suppressor of cytokine signaling (SOCS-3). *Eur Cytokine Netw*. 2001;12:309-315.
- Weidenfeld J, Shu W, Zhang L, Miller SE, Momsey EE. The WNT7b promoter is regulated by TTF-1, GATA6, and Foxa2 in lung epithelium. *J Biol Chem*. 2002;277:21061-21070.
- Szczepanski T, van't Veer MB, Wolvers-Tettero B, Langerak AW, van Dongen JJ. Molecular features responsible for the absence of immunoglobulin heavy chain protein synthesis in an Ig $\kappa$ - subgroup of multiple myeloma. *Blood*. 2000;96:1087-1093.
- Roodman GD. Biology of osteoclast activation in cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19:3582-3571.
- Lacy MG, Donovan KA, Heimbach JK, Ahmann GJ, Lust JA. Comparison of interleukin-1 beta expression by *in situ* hybridization in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Blood*. 1999;93:300-306.
- Sati H, Greaves M, Apperley JF, Russell RG, Croucher PI. Expression of interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha in plasma cells from patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1998;104:350-357.
- Choi SJ, Cruz JC, Craig F, et al. Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. *Blood*. 2000;96:671-675.
- Momsey EE, Ip HS, Lu MM, Parnacek MS. GATA-6, a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev Biol*. 1996;177:309-322.
- Huguet EL, McMahon JA, McMahon AP, Bicknell R, Harris AL. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res*. 1994;54:2815-2821.
- Bui TD, O'Brien T, Crew J, Cranston D, Harris AL. High expression of Wnt7b in human superficial bladder cancer vs invasive bladder cancer. *Br J Cancer*. 1998;77:319-324.
- Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood*. 2002;99:1745-1757.
- De Vos J, Couderec G, Tarte K, et al. Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by using complementary DNA arrays. *Blood*. 2001;98:771-780.
- Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*. 2000;103:311-320.
- Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 2000;14:1837-1851.
- Quang MW, Romanow WJ, Munc C. E protein function in lymphocyte development. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:301-322.
- Engel I, Munc C. The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. *Nat Rev Immunol*. 2001;1:183-189.
- Quang MW, Harris DP, Swain SL, Munc C. E2A activity is induced during B-cell activation to promote immunoglobulin class switch recombination. *EMBO J*. 1999;18:6307-6318.
- Claudio JO, Mash-Khan E, Tang H, et al. A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. *Blood*. 2002;100:2175-2186.
- Kaser A, Dürzendorfer S, Offner FA, et al. A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *J Immunol*. 1999;163:3232-3238.
- Kaser A, Dürzendorfer S, Offner FA, et al. B lymphocyte-derived IL-16 attracts dendritic cells and Th cells. *J Immunol*. 2000;165:2474-2480.
- Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today*. 1998;17:476-481.
- Kitchen SG, LaForge S, Patel VP, et al. Activation of CD8 T cells induces expression of CD4, which functions as a chemotactic receptor. *Blood*. 2002;99:207-212.
- Cruikshank WW, Lim K, Theodore AC, et al. IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation. *J Immunol*. 1996;157:5240-5248.
- Koike M, Sekigawa I, Okada M, et al. Relationship between CD4(+)CD8(+) T cell ratio and T cell activation in multiple myeloma: reference to IL-16. *Leuk Res*. 2002;28:705-711.
- San Miguel JF, Gonzalez M, Gascon A, et al. Lymphoid subsets and prognostic factors in multiple myeloma. Cooperative Group for the Study of Monoclonal Gammopathies. *Br J Haematol*. 1992;80:305-309.
- Reelgita V, Boccardo M, Battagio S, et al. Multiple myeloma: altered CD4/CD8 ratio in bone marrow. *Haematologica*. 1990;75:129-131.
- Bai L, Merchant JL. ZBP-89 promotes growth arrest through stabilization of p53. *Mol Cell Biol*. 2001;21:4670-4683.
- Chai YL, Cui J, Shao N, et al. The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/CIP1 promoter. *Oncogene*. 1999;18:263-268.
- Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, et al. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene*. 1999;18:1713-1721.
- Facon T, Avez-Loiseau H, Guillem G, et al. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood*. 2001;97:1565-1571.
- Moreau P, Facon T, Lefeu X, et al. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood*. 2002;100:1579-1583.
- Kumano K, Chiba S, Shimizu K, et al. Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood*. 2001;98:3283-3289.
- Luo B, Aster JC, Hasslerjan RP, Kuo F, Sidlar J. Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor. *Mol Cell Biol*. 1997;17:6057-6067.
- Miner LA, Bigas A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood*. 1999;93:2431-2448.
- Townsend KJ, Zhou P, Qian L, et al. Regulation of MCL1 through a serum response factor/EK-1-mediated mechanism links expression of a viability-promoting member of the BCL2 family to the induction of hematopoietic cell differentiation. *J Biol Chem*. 1999;274:1801-1813.
- Derenne S, Morin B, Dean NM, et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-xL is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood*. 2002;100:194-199.
- Zhang B, Goto I, Fenton RG. Myeloid cell factor-1

- is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood*. 2002;99:1885-1893.
55. Liou ML, Liou HC. The ubiquitin-homology protein, DAP-1, associates with tumor necrosis factor receptor (p50) death domain and induces apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274:10145-10153.
  56. Vesole DH, Tricot G, Jagannath S, et al. Auto-transplants in multiple myeloma: what have we learned? *Blood*. 1996;88:836-847.
  57. Choi SJ, Oba Y, Gazitt Y, et al. Antisense inhibition of macrophage inflammatory protein 1-alpha blocks bone destruction in a model of myeloma bone disease. *J Clin Invest*. 2001;108:1833-1841.
  58. Han JH, Choi SJ, Kurihara N, et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha is an osteoclastogenic factor in myeloma that is independent of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *Blood*. 2001;97:3349-3353.
  59. Abe M, Hiura K, Wilde J, et al. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood*. 2002;100:2195-2202.
  60. Massey HM, Scopes J, Horton MA, Flanagan AM. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta) stimulates the osteoclast-forming potential of peripheral blood hematopoietic precursors in a lymphocyte-rich microenvironment. *Bone*. 2001;28:577-582.
  61. Gunn JM, Itoh K, Udagawa N, et al. Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res*. 2001;16:1787-1794.
  62. Yan T, Riggs BL, Boyle WJ, Khosla S. Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF-beta1. *J Cell Biochem*. 2001;83:320-325.
  63. Kaneko H, Arakawa T, Mano H, et al. Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone*. 2000;27:479-486.
  64. Sahamnen J, Taipale J, Morni O, Keski-Oja J. Identification and characterization of a new latent transforming growth factor-beta-binding protein, LTBP-4. *J Biol Chem*. 1998;273:18459-18469.
  65. Soubrier MJ, Dubost JJ, Sauvezie BJ. POEMS syndrome: a study of 25 cases and a review of the literature. French Study Group on POEMS Syndrome. *Am J Med*. 1994;97:543-553.
  66. Bataille R, Chappard D, Marcelli C, et al. Osteoclast stimulation in multiple myeloma lacking lytic bone lesions. *Br J Haematol*. 1990;76:494-497.
  67. Choi SJ, Roodman GD. Transcriptional regulation of macrophage inflammatory protein 1-alpha expression in myeloma bone disease [abstract]. ASH 43rd Annual meeting. 2001.

### **V.5.2 Mise en évidence de gènes impliqués dans les lésions osseuses du myélome**

D'autres études se sont intéressées spécifiquement à l'atteinte osseuse dans le myélome. Tian (Tian et al, 2003) a comparé les profils d'expression génique de plasmocytes médullaires de 137 patients ayant des lésions osseuses focales en IRM avec ceux de 36 patients sans lésion osseuse, 16 MGUS, 45 sujets normaux et 9 Waldenström. Cinquante sept gènes discriminants entre les patients avec ou sans atteinte osseuse ont été identifiés. Quatre de ces gènes étaient significativement surexprimés chez les patients avec atteinte osseuse. L'un de ces gènes, dickkopf1 (DKK1) est lié à l'activité des ostéoblastes. DKK1 est un inhibiteur de la voie Wnt qui est impliquée dans la croissance et la différenciation des ostéoblastes. DKK1 inhibe l'ostéof ormation en désactivant la voie Wnt. Les analyses en immunohistochimie sur des prélèvements de moelle ont montré que les plasmocytes étaient les seules cellules à exprimer DKK1. Par ailleurs, les taux de DKK1 dans le sang périphérique et le plasma de moelle étaient corrélés à l'expression du gène et associés à l'existence de lésions osseuses. DKK1 était moins exprimé dans les myélomes sans atteinte osseuse et dans les MGUS. Il n'était pas exprimé chez les sujets normaux ou les Waldenström. Les auteurs ont confirmé le rôle de DKK1 dans la différenciation des ostéoblastes avec un modèle de différenciation induite par BMP2 (via la voie Wnt) d'une lignée de cellules mésenchymateuses immortalisées. L'ajout de DKK1 recombinant ou de plasma de moelle de patients avec atteinte osseuse inhibait la différenciation in vitro des ostéoblastes.

Par ailleurs, les ostéoblastes immatures produisent du RANK ligand. L'interaction entre RANK ligand et RANK (ostéoprotégérine) joue un rôle majeur dans l'activation et la survie des ostéoclastes. Une élévation sérique de RANK ligand est associée à l'augmentation des marqueurs de résorption osseuse, l'augmentation des lésions lytiques et à une diminution de la survie. Ainsi, DKK1 pourrait stimuler les ostéoclastes en induisant immaturité des ostéoblastes et donc la production de RANK ligand. L'action de DKK1 pourrait donc être double associant une inhibition des ostéoblastes et une activation des ostéoclastes.

## **V.6 Classifications moléculaires des myélomes**

Les premières études ayant validé les méthodes de purification des plasmocytes et d'analyse des résultats, les études suivantes ont cherché à améliorer la classification des myélomes en essayant de la corrélérer avec le pronostic. Ces études ont démontré que le myélome pouvait faire l'objet de classification moléculaire.

### **V.6.1 Classification basée sur l'expression des cyclines**

Plusieurs études ont montré que la dérégulation des gènes d'une des 3 cyclines est un événement très précoce et commun dans le myélome. Bergsagel a utilisé les translocations et les niveaux d'expression des cyclines pour définir 8 groupes de patients (Bergsagel et al, 2005). Les 4 premiers groupes étaient basés sur les translocations récurrentes : 4p16, MAF, 6p21, 11q13. Les 4 autres groupes étaient basés sur l'augmentation d'expression de la cycline D1 ou D2 par comparaison avec les cellules normales : groupes D1, D2, D1+2 (expression des deux cyclines) et un groupe appelé « none » qui n'exprimait aucune des 3 cyclines.

Les auteurs ont étudié les profils d'expression de 231 patients au diagnostic, 30 en rechute, 12 MGUS, 32 lignées de myélome et 14 échantillons normaux. Les patients ont été affectés à un des 8 groupes TC (translocation / cycline D) sur la base de l'expression de 8 gènes. (CCND1, CCND2, CCND3, FGFR3, MMSET, MAF, ITGB7, CX3CR1). Cette classification basée sur les données des profils d'expression génique a été validée par des analyses caryotypiques chez 101 patients.

Cinq cent soixante seize gènes dont l'expression était significativement dérégulée entre les 8 groupes ont été identifiés. Une analyse hiérarchique sur la base de l'expression de ces gènes a montré qu'il existait une signature d'expression particulièrement marquée pour les groupes MAF 4p16 et D1. A l'inverse, les groupes 6p21 et 11q13 avaient des signatures qui se chevauchaient et étaient partagées avec la majorité des autres groupes. Donc, des événements oncogéniques précoces semblent influencer sur la signature génique malgré des événements secondaires de progression identique.

L'existence de lésions osseuses a été évaluée par IRM chez 172 patients, 79% des patients avaient des lésions lytiques. La fréquence des lésions lytiques était plus importante dans les groupes 11q13 (94%), D1 (88%) et D1+D2 (100%) et significativement plus faible dans les groupes 4p16 (57%) et MAF (55%). Le groupe D1 était moins fréquent chez les patients en rechute (10% vs 34%) et le groupe D1+D2 plus fréquent (17% vs 6,5%). Les lignées étaient plus fréquentes que les myélomes dans les groupes 4p16 (respectivement 31% et 16%) et MAF (28% et 7%).

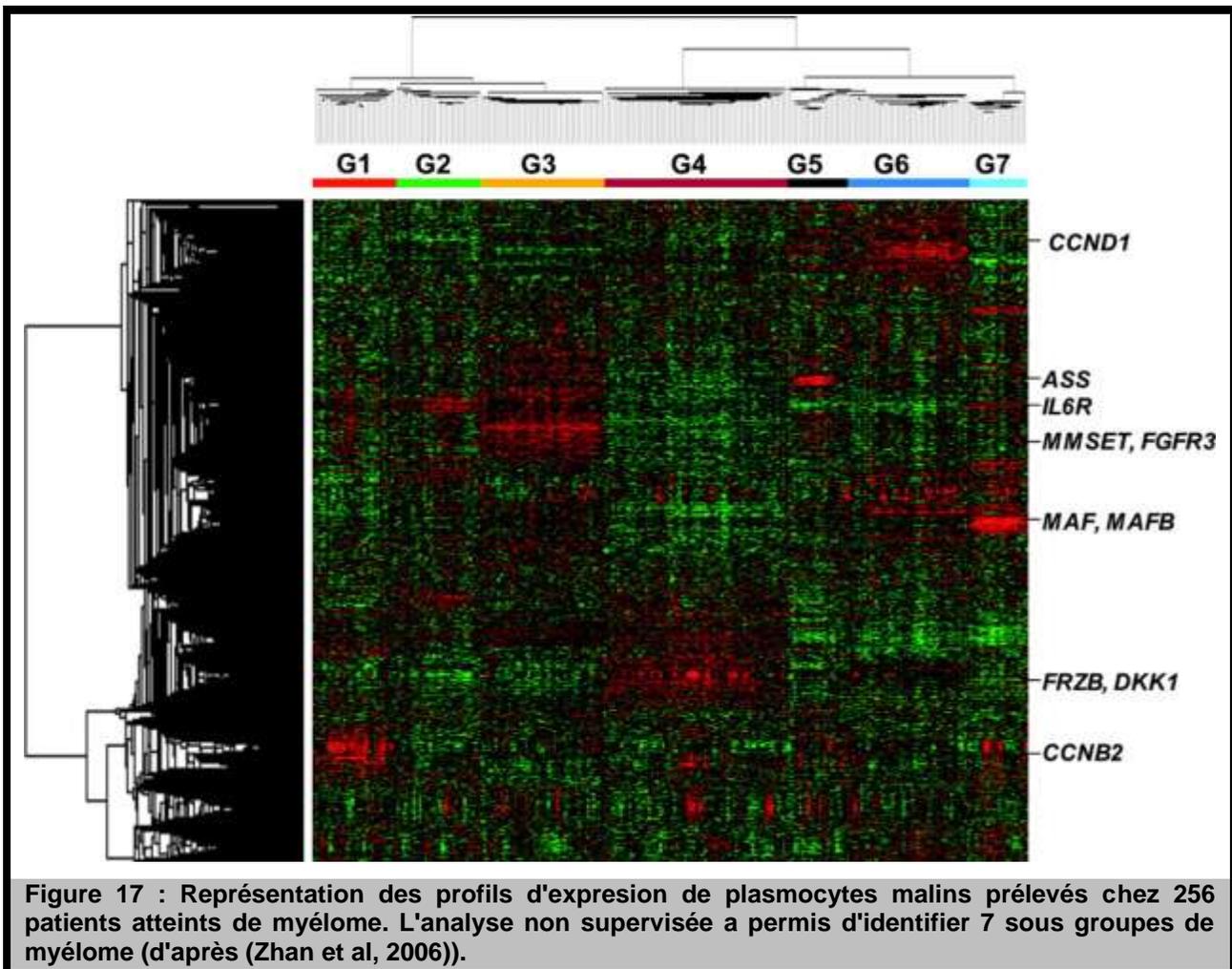
L'intérêt de cette classification est de montrer que des événements précoces dans l'oncogenèse peuvent avoir des conséquences sur la signature génique et sont corrélés avec l'évolution clinique des patients, le stade de la maladie (rechute, lignées,...) Son principal défaut est qu'elle n'identifiait pas clairement les hyperdiploïdes (qui étaient majoritairement D1 ou D1+D2).

### V.6.2 Classification sur la base des profils d'expression génique

L'équipe de Shaughnessy (Zhan et al, 2006) a étudié les profils d'expression génique des plasmocytes médullaires d'une cohorte de 256 patients inclus dans le protocole « total therapy 2 » (cohorte d'entraînement) et d'une cohorte de 158 patients inclus dans le protocole « total therapy 3 » (cohorte de validation). L'analyse non supervisée des profils d'expression génique de la cohorte d'entraînement a mis en évidence 7 sous groupes de myélomes (figure 17). L'analyse des signatures d'expression montrait que ces sous-groupes étaient liés à l'expression de gènes impliqués dans les translocations 14q32 (FGFR3, CCND1, MAF,...) ou à l'hyperdiploïdie. Les 7 groupes identifiés étaient les suivants :

- **MF (groupe 7) :** caractérisé par un pic d'expression de MAF (lié à la translocation t(14 ;16)) ou MAFB (lié à la translocation t(14 ;20)). Une des caractéristiques de ce groupe était une sous expression de DKK1 (gène qui est impliqué dans l'apparition des atteintes osseuses du myélome).
- **MS (groupe 3) :** caractérisé par un pic d'expression de FGFR3 ou de MMSET (lié à la translocation t(4 ;14)).
- **CD 1 (groupe 5) :** caractérisé par un pic d'expression de CCND1 (lié à la translocation t(11 ;14)).

- **CD 2 (groupe 6) :** caractérisé par un pic d'expression de CCND3 (lié à la translocation t(6 ;14)).
- **HD (groupe 4) :** caractérisé par une signature hyperdiploïde et associé à un caryotype hyperdiploïde dans 90% des cas.
- **LB pour low bone disease (groupe 2) :** sans signature d'expression particulière mais caractérisé par une sous expression de DKK1.
- **PR pour prolifération group (groupe 1) :** caractérisé par la surexpression de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération. L'indice de prolifération estimé par profils d'expression génique était plus élevé dans ce groupe.

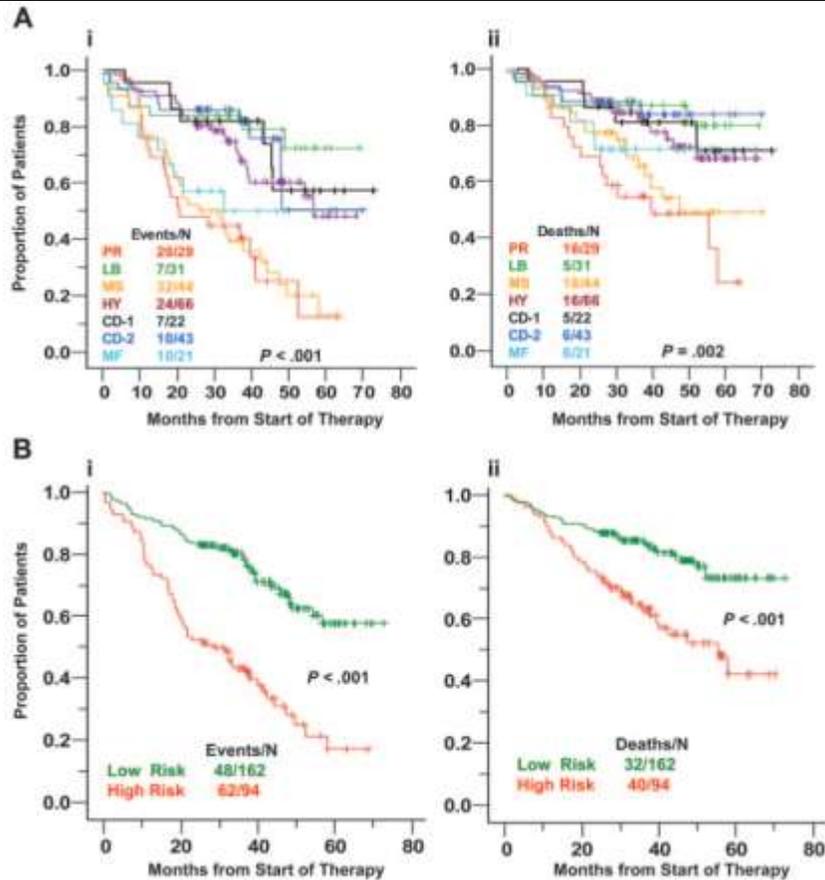


Les gènes spécifiquement sur ou sous exprimés dans chacun des groupes par rapport aux autres ont été identifiés par analyse SAM (Significant Analysis of Microarrays). Cent gènes par groupe

ont ainsi été sélectionnés (50 gènes sur exprimés et 50 sous exprimés) constituant la signature d'expression spécifique de chacun des 7 groupes identifiés et permettant de prédire l'appartenance d'un échantillon à l'un des groupes. Ce modèle classait correctement 98% des patients de la cohorte d'entraînement. L'utilisation de ce modèle dans la cohorte de validation trouvait une répartition identique des 7 sous groupes malgré des différences d'effectifs entre les 2 cohortes.

Les caractéristiques biologiques des différents sous groupes étaient différentes. Ainsi, le groupe PR était associé à une plus grande fréquence des anomalies cytogénétiques, un taux de  $\beta 2m$  et de LDH plus élevé et à un taux d'albumine plus faible. Le groupe MS était corrélé à une albuminémie plus faible et le groupe MS à un taux de  $\beta 2m$  plus élevé. Le groupe LB était associé à un taux de lésions osseuses en IRM plus faible que les autres groupes (30% dans la cohorte d'entraînement et 21% dans la cohorte de validation). Ces données montraient que des signatures d'expression différente étaient corrélées à des manifestations cliniques ou biologiques différentes.

La durée de suivi prolongée des patients dans la cohorte d'entraînement (médiane 36 mois) autorisait à rechercher un lien entre les signatures d'expression et la survie. Les groupes HY, LB, CD-1 et CD-2 (qualifiés de groupes à faible risque) étaient associés à une survie globale et sans événement plus prolongée que les groupes PR, MS, MF (groupes à haut risque). La survie sans événement à 48 mois était estimée à 68% pour les groupes à faible risque et 31% pour les groupes à haut risque ( $p < 0,001$ ). La survie globale à 48 mois était estimée respectivement à 79% et 51% ( $p < 0,001$ ). En analyse multivariée, ces groupes génétiques, le taux de  $\beta 2m$ , le taux de LDH et l'existence d'anomalies cytogénétiques étaient des marqueurs prédictifs indépendants de la survie. Faute de recul évolutif suffisant, ces résultats n'ont pas pu être validés dans la cohorte de validation.



**Figure 18 : Survie en fonction de la classification moléculaire identifiée par Zhan. Les groupes PR, MS et MF sont considérés à haut risque (d'après (Zhan et al, 2006)).**

Cette étude était la première dans le myélome à démontrer que les profils d'expression génique peuvent permettre d'identifier des sous groupes de patients de pronostics différents.

Il est intéressant de noter que cette classification moléculaire était liée à des événements génétiques précoces (translocation et hyperdiploïdies).

Dans une autre étude menée à la même période (Zhan et al, 2007), Zhan a comparé les profils d'expression génique de plasmocytes médullaires normaux (22 échantillons) de MGUS (24) et de myélome (351). L'analyse par SAM a identifié 52 gènes dont l'expression était dérégulée. Ces gènes étaient impliqués dans des mécanismes cellulaires variés potentiellement liés à l'oncogénèse (cycle cellulaire, synthèse d'ADN, transcription, voies de signalisation, résistance aux traitements, mort cellulaire, apoptose,...). Les données d'expression de ces 52 gènes ont été

utilisées pour effectuer un classement hiérarchique non supervisé de 44 MGUS, 12 myélomes indolents, 16 myélome post MGUS et 351 myélomes. L'une des deux branches issues de ce classement regroupait 41 (93%) MGUS, 8 (67%) SMM, 7 (44%) myélomes post MGUS et 99 (28%) myélomes. Les myélomes de ce groupe avaient donc une signature d'expression proche des MGUS (signature MGUS) et ont été qualifiés de « myélomes-MGUS ». A l'inverse, les 252 (72%) autres myélomes ont été qualifiés de « myélomes non MGUS ».

La fréquence de plusieurs marqueurs de mauvais pronostic était plus forte dans le groupe des « myélomes non MGUS »:  $\beta$ 2m élevée, LDH augmentée, plasmocytose médullaire supérieure à 30%, anomalies cytogénétiques, groupes moléculaires de haut risque (PR, MS, MF). Les patients avaient été inclus dans le protocole « total therapy 2 ». Les « myélomes-MGUS » avaient une survie à 5 ans plus élevée (76%) que les « myélomes non MGUS » (59%). En analyse multivariée, la signature « myélomes non MGUS », la diminution de l'albuminémie, l'augmentation des LDH, l'appartenance à un groupe moléculaire de haut risque (PR, MS, MF), et l'existence de lésions osseuses à l'IRM étaient des facteurs prédictifs indépendants de la survie.

La signature de 52 gènes a été testée sur une cohorte de validation de 214 patients inclus dans le protocole « total therapy 3 » et a identifié 55 (28%) de « myélomes-MGUS ». Faute de recul évolutif suffisant, la survie n'a pas pu être étudiée dans la cohorte de validation mais comme pour la cohorte d'entraînement, la fréquence des facteurs de mauvais pronostic était plus forte pour les « myélomes non MGUS ». La signature « myélomes-MGUS » a également été identifiée chez 15 sur 20 patients qui avaient été inclus dans le protocole « total therapy 1 » avec une survie prolongée à plus de 10 ans avant autogreffe.

Ces 2 études de la même équipe ont démontré que les profils d'expression génique peuvent permettre d'identifier des groupes de myélome ayant des pronostics différents. Cependant, elles illustrent le fait que les groupes définis vont être différents en fonction des échantillons utilisés pour les identifier.

Par ailleurs, ces classifications, sous tendues par des anomalies connues, sont intéressantes mais ne sont probablement pas les plus pertinentes pour une utilisation en pratique clinique.

Depuis la publication de ces études, l'équipe de Shaughnessy et notre équipe ont développé des prédicteurs moléculaires de la survie basés sur l'expression d'un petit nombre de gènes et permettant de prédire avec sensibilité la survie des patients. Ces études ont été menées à la même période et publiées récemment.

## V.7 Recherche de marqueurs moléculaires prédictifs

Plusieurs équipes dont la nôtre, ont mené concurremment des études dont l'objectif était d'identifier des marqueurs moléculaires prédictifs de la survie ou de la réponse au traitement.

### V.7.1 ARTICLE 2– Identification d'un score prédictif de la survie (Score IFM) et basé sur l'expression de 15 gènes

L'objectif de la deuxième étude menée dans l'équipe était d'identifier un prédicteur moléculaire de la survie dans le myélome et de mieux comprendre la biologie des patients à haut risque.

Nous avons analysé les profils d'expression génique de 250 patients ayant un myélome au diagnostic et inclus dans les essais IFM 99. Tous les patients ont reçu un traitement intensif soutenu par une autogreffe. Certains patients avaient un traitement d'entretien par thalidomide. Les 250 patients ont été sélectionnés parmi 983 patients ayant eu des prélèvements de moelle. La sélection des patients était basée sur l'obtention d'au moins 500 000 plasmocytes médullaires. Les caractéristiques initiales et la survie des 250 patients analysés étaient comparables à celles des 733 patients non analysés (figure 19).

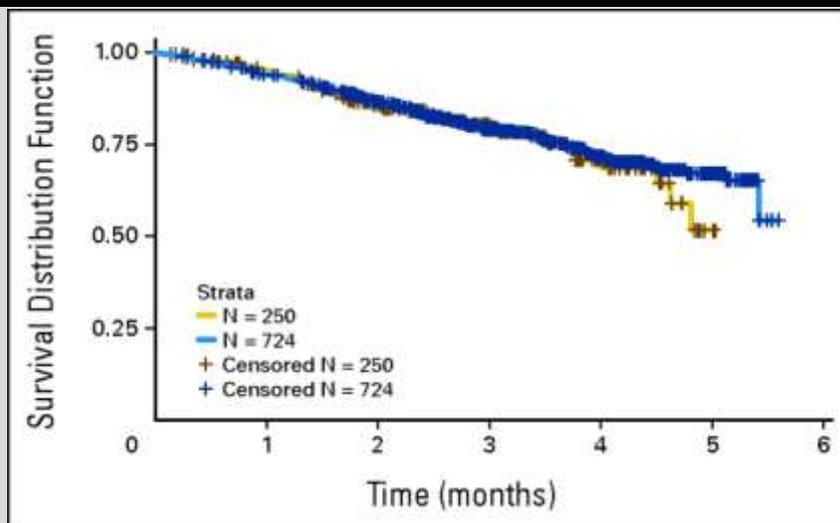


Figure 19 : Survie des patients inclus dans l'analyse génomique (courbe jaune) et des patients non inclus dans l'analyse (courbe bleue).

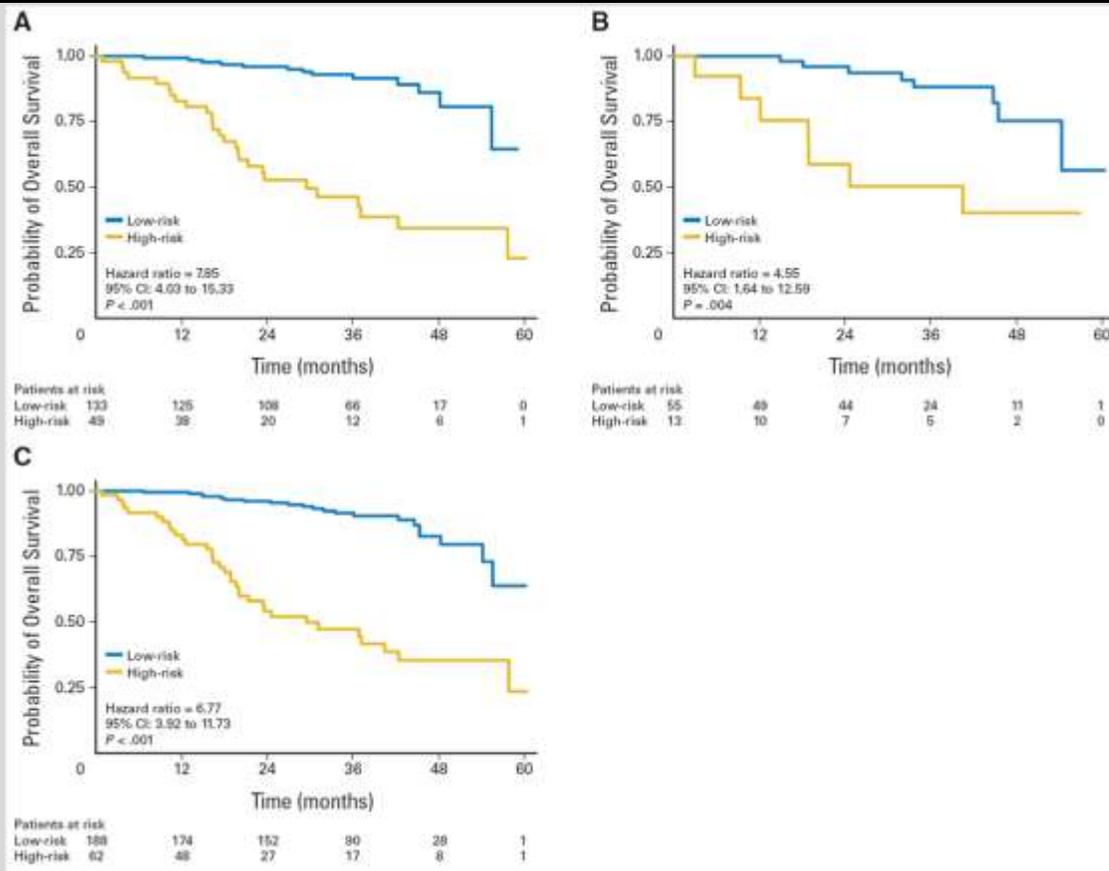
Cinquante cinq patients sont décédés pendant le suivi (médiane de suivi : 35 mois). Les patients ont été séparés en une cohorte d'entraînement (182 patients) utilisée pour l'élaboration du prédicteur et une cohorte de validation (68 patients) pour validation interne du prédicteur identifié. Les caractéristiques initiales et évolutives des patients étaient comparables dans les deux cohortes.

#### **V.7.1.1 Elaboration d'un score prédictif :**

Une analyse de Cox univariée sur les 7 508 gènes a été menée pour identifier les gènes associés à la survie dans la cohorte d'entraînement. A partir des 50 gènes initialement identifiés, un modèle pronostique composé des 15 gènes les plus stables a été construit. Une analyse en composante principale a été menée pour établir un score résumant l'expression des 15 gènes (score IFM). La valeur de ce score de risque a été calculée pour chaque patient puis les patients répartis en quartiles sur la base du score de risque :

- quartiles 1 ou 2 = très faible risque
- quartiles 1,2 ou 3= faible risque
- quartiles 4 = haut risque

Sur l'ensemble des patients de la cohorte, la survie à 3 ans des patients de faible risque et de haut risque était respectivement de 90,5% et 47,4%. Le modèle ainsi défini était très significativement prédictif de la survie dans la cohorte d'entraînement ( $p < 0,001$ ) et dans la cohorte de validation ( $p = 0,004$ ) (figure 20). La validité de ce score a été confirmée sur des cohortes externes de patients correspondants à 853 patients au diagnostic ou en rechute traités par traitement intensif ou bortezomib (cf V.7.4)



**Figure 20 : Survie en fonction du score IFM.**

(A) Sur la cohorte d'entraînement, (B) sur la cohorte de validation, (C) sur l'ensemble de la cohorte.

### ***V.7.1.2 Comparaison du score prédictif avec les biomarqueurs pronostiques habituels***

Le groupe à haut risque (quartile 4) était associé aux anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic : del13, t(4;14) et del17. A l'inverse, le groupe de très faible risque quartile 1 ou quartile 2 était associé à la translocation t(11;14) et à l'hyperdiploïdie. Une analyse univariée et multivariée a été menée pour déterminer le poids pronostique de chacun des marqueurs habituels et de notre score.

- En analyse univariée les facteurs prédictifs de la survie étaient : le score IFM, un taux de  $\beta 2m > 5,5$  mg/l, une thrombopénie  $< 130\ 000/mm^3$ , une délétion du chromosome 13 et une t(4;14).

- En analyse multivariée seule la  $\beta 2m$  (HR 2,80), la t(4;14) (HR 2,78) et le score IFM (HR 6,06) étaient identifiés comme facteurs prédictifs de la survie. La combinaison de ces 3 facteurs

identifiait un sous groupe de 12,5% patients ayant un risque très élevé, avec une survie à 3 ans de seulement 34% (figure 22 et tableau 9).

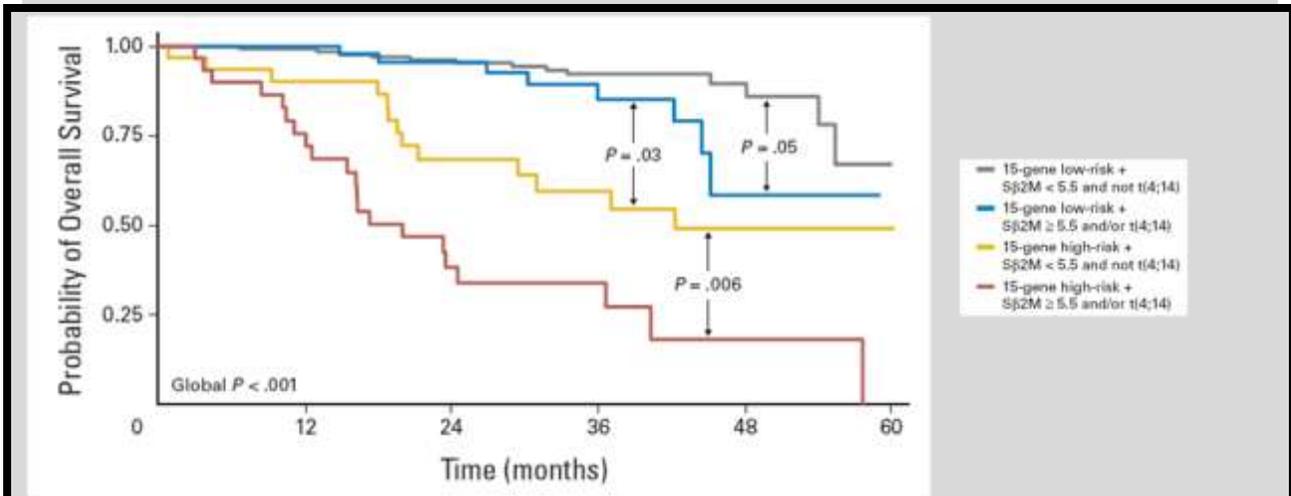


Figure 21 : Survie en fonction du score IFM, du taux de beta2 microglobuline (valeur seuil 5,5 mg/l) et de la t(4;14).

**Table A4.** Kaplan-Meier Estimates of the Rate of Survival at 3 Years According to Combination of the 15-Gene Model, t(4;14), and Sβ2M Categories

Risk Group	% of Cases	3-Year OS, %	95% CI
15-gene low-risk + Sβ2M < 5.5 mg/L and not t(4;14)	56	92	85 to 96
15-gene low-risk + Sβ2M ≥ 5.5 mg/L and/or t(4;14)	19.2	85	64 to 94
15-gene high-risk + Sβ2M < 5.5 mg/L and not t(4;14)	12.4	62	39 to 78
15-gene high-risk + Sβ2M ≥ 5.5 mg/L and/or t(4;14)	12.4	34	17 to 52

Abbreviations: OS, overall survival; Sβ2M, serum β<sub>2</sub>-microglobulin.

Tableau 9: Impact pronostique sur la survie du score IFM, du taux de beta2 microglobuline (valeur seuil 5,5 mg/l) et de la t(4;14).

### V.7.1.3 Biologie associée au haut risque.

Une analyse dite de « gene set enrichment analysis » (GSEA) a été menée pour identifier les caractéristiques biologiques des groupes extrêmes. Cette analyse informatique vise à déterminer si un groupe de gènes définis a priori a une différence d'expression concordante et significative entre deux groupes de patients (ici entre les patients à haut risque et à faible risque). En d'autres termes, cette analyse utilise des listes de gènes (reliés par des processus cellulaires, des caractéristiques chromosomiques, ...) et recherche si l'expression de ces gènes est dérégulée de manière similaire entre deux groupes échantillons. Cette méthode permet une analyse plus biologique des profils d'expression génique qui n'est plus basée uniquement sur des listes de

gènes sans lien entre eux. Beaucoup des gènes de la signature haut risque étaient impliqués dans la régulation du cycle cellulaire : contrôle du cycle cellulaire, réplication ADN, réparation ADN, mitose, point de contrôle de l'assemblage du fuseau,... Un des points notables était la surexpression de gènes impliqués dans le contrôle de la ségrégation équilibrée des chromosomes (AD2 et BUBR1). Ces résultats suggèrent que les cellules des patients de haut risque ont un dysfonctionnement des mécanismes de contrôle de la mitose et de la ségrégation équilibrée des chromosomes. Cela pourrait maintenir un taux modéré d'instabilité chromosomique et d'aneuploïdie. Les profils d'expression des patients de faible risque étaient plus hétérogènes avec seulement 3 signatures significatives. Deux de ces 3 signatures étaient reliées à l'hyperdiploïdie et une à la synthèse protéique. Il est à noter que 50% des hyperdiploïdes (en FISH) étaient classés dans le groupe à faible risque.

Notre étude a démontré qu'une analyse des profils d'expression génique sur des prélèvements effectués en multicentrique est possible et permet d'identifier un score prédictif de la survie.

# **COPIE DE L'ARTICLE 2**

## Prediction of Survival in Multiple Myeloma Based on Gene Expression Profiles Reveals Cell Cycle and Chromosomal Instability Signatures in High-Risk Patients and Hyperdiploid Signatures in Low-Risk Patients: A Study of the Intergroupe Francophone du Myélome

Olivier Decaux, Laurence Lodé, Florence Magrangeas, Catherine Charbonnel, Wilfried Gouraud, Pascal Jézéquel, Michel Attal, Jean-Luc Harousseau, Philippe Morceau, Régis Bataille, Loïc Campion, Hervé Avet-Loiseau, and Stéphane Minvielle

### ABSTRACT

#### Purpose

Survival of patients with multiple myeloma is highly heterogeneous, from periods of a few weeks to more than 10 years. We used gene expression profiles of myeloma cells obtained at diagnosis to identify broadly applicable prognostic markers.

#### Patients and Methods

In a training set of 182 patients, we used supervised methods to identify individual genes associated with length of survival. A survival model was built from these genes. The validity of our model was assessed in our test set of 68 patients and in three independent cohorts comprising 853 patients with multiple myeloma.

#### Results

The 15 strongest genes associated with the length of survival were used to calculate a risk score and to stratify patients into low-risk and high-risk groups. The survival-predictor score was significantly associated with survival in both the training and test sets and in the external validation cohorts. The Kaplan-Meier estimates of rates of survival at 3 years were 90.5% (95% CI, 85.6% to 95.3%) and 47.4% (95% CI, 33.5% to 60.1%), respectively, in our patients having a low risk or high risk independently of traditional prognostic factors. High-risk patients constituted a homogeneous biologic entity characterized by the overexpression of genes involved in cell cycle progression and its surveillance, whereas low-risk patients were heterogeneous and displayed hyperdiploid signatures.

#### Conclusion

Gene expression–based survival prediction and molecular features associated with high-risk patients may be useful for developing prognostic markers and may provide basis to treat these patients with new targeted antimetabolites.

*J Clin Oncol* 26:4798-4805. © 2008 by American Society of Clinical Oncology

### INTRODUCTION

Despite recent progress in the management of patients, multiple myeloma (MM) remains an incurable disease, with a 5-year survival rate not exceeding 40%. However, this uniform evolution hides wide clinical and pathophysiologic heterogeneities. Patients experience survival periods of a few months to more than 10 years. Identifying risk groups with a high predictive power could contribute to select patients for personalized treatment. For 25 years, serum  $\beta_2$ -microglobulin (S $\beta$ 2M) was considered as the single most powerful prognostic factor.<sup>1</sup> Re-

cently, a multivariate meta-analysis of clinical and laboratory data obtained from 10,750 previously untreated patients with myeloma validated S $\beta$ 2M as a major prognostic factor to define poor risk and identified serum albumin as the second dominant prognostic factor. Both parameters were combined in a novel staging system referred to as the International Staging System (ISS).<sup>2</sup> However, the ISS was not powerful enough to recognize the highest-risk patients.<sup>2</sup> The assessment of chromosomal abnormalities, such as t(4;14) or del(17p), has been shown to be useful in refining identification of these patients.<sup>3</sup> Although powerful, genetic abnormalities

From L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U892, University of Nantes, University Hospital, Hematology Laboratory, Nantes; Centre de Lutte contre le Cancer Nantes Atlantique, Nantes-Saint Herblain; and University Hospital, Hematology Department, Toulouse, France.

Submitted August 3, 2007; accepted April 24, 2008; published online ahead of print at www.jco.org on June 30, 2008.

Supported in part by grants from the International Myeloma Foundation, the Ligue contre le Cancer (Equipe Labellisée), and the Cancéropole Grand Ouest.

L.C., H.A.L., and S.M. contributed equally to this work.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

Corresponding author: Stéphane Minvielle, MD, INSERM U892 Institute of Biology, 9 Quai Monceau, Nantes 44093, France; e-mail: sminvielle@chu-nantes.fr.

© 2008 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/08/2629-4798/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2007.13.8546

targeted small subsets of patients and do not account for all the heterogeneity in the clinical outcome. Molecular signatures capturing gene expression data recently emerged as powerful tools to identify patients at high risk of death, as well as to define biologic entities associated with risk groups.<sup>4</sup> Toward identification of low-risk and high-risk patients with MM and better understanding of their malignant plasma cell biology, we analyzed the gene expression profiles of 250 newly diagnosed patients with MM treated with high-dose therapy. We developed an expression-based multivariate model that predicts disease outcome. We found that myeloma cells from high-risk patients overexpressed genes involved in mitosis and its surveillance, whereas the profile of myeloma cells from very low-risk patients was more heterogeneous and included hyperdiploid MM gene signatures.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

Two hundred fifty patients with myeloma at diagnosis with at least 500,000 available bone marrow CD138+ plasma cells were identified from the 983 patients analyzed for del(13) by interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in the hematology department at University Hospital in Nantes, France, between April 2000 and October 2003. The absence of bias between genomic and nongenomic subsets was verified (Appendix Table A1 and Fig A1, online only).

Approval for this study was obtained from medical ethical committees and institutional review boards of the University Hospitals of Nantes, Toulouse, and Grenoble. Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. All patients received high-dose chemotherapy with stem-cell transplantation according to the IFM 99 clinical trials, conducted by the Intergroupe Francophone du Myélome (IFM). Fifty-five patients died because of their disease during follow-up. Overall survival (OS) was calculated from the diagnosis.

### Sample Collection, Plasma Cell Purification, and Total RNA Extraction and Purification

Bone marrow specimens from untreated patients with MM were obtained during standard diagnostic procedures in IFM centers and shipped overnight to the hematology department at University Hospital in Nantes. Plasma cell purification was performed as previously described.<sup>5</sup> In all cases, purity of the plasma cells was higher than 90%, as assessed by morphology. Total RNA extraction and purification were performed as previously described.<sup>6</sup>

### cDNA Microarray Technology

One-channel DNA microarrays were constructed from 17,134 Expressed Sequence Tag cDNA clones representing 11,250 unique genes (based on *Homo sapiens* UniGene Build #196, issued in October 2006). The feasibility, reproducibility, and sensitivity of spotting procedures onto nylon membrane currently used in our laboratory to produce cDNA arrays have been previously described.<sup>6-9</sup> All procedures, including normalization, are available in the Appendix (online only).

### Data Availability

The microarray data analyzed in this study have been deposited in the National Institutes of Health Gene Expression Omnibus database at www.ncbi.nlm.nih.gov/gso under the accession number GSE7039.

### Interphase Cytogenetics Analysis

The chromosome 1q gain was assessed using a bacterial artificial clone probe (RPC111-307c12) at 1q21. The other chromosomal aberrations, del(13q14), t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32), hyperdiploidy, and del(17p13), have already been reported in a previous study.<sup>1</sup>

### Statistical Analysis

SAS System version 9.1 (SAS Institute Inc, Cary, NC) and BRB-ArrayTools software (developed by R. Simon and A. Peng, version 3.4.0) were used to perform statistical analyses.<sup>10</sup>

Training-test mode was chosen for internal validation in a 3/4-1/4 manner to obtain sufficiently large groups. Training (182 patients) and test (68 patients) sets were stratified according to death and known confounders. Absence of significant difference between training and test sets for baseline characteristics was verified before gene determination to avoid confounding, which could occur if the main prognostic factors were not equally distributed among the two sets (Table 1).

Raw intensities of the microarrays data were transformed into log intensities before proceeding with statistical analysis. Univariate Cox analyses were conducted on the 7,508 gene probes that passed the normalization procedure. Development of the gene expression-based prognostic model is described in the Appendix. Univariate and multivariate Cox regression analyses were performed for each biochemical variable and the IFM 15-gene model in the original data set. Bootstrap and permutation techniques were used to assess the statistical significance obtained with the original data sets. Details of this procedure are presented in the Appendix.

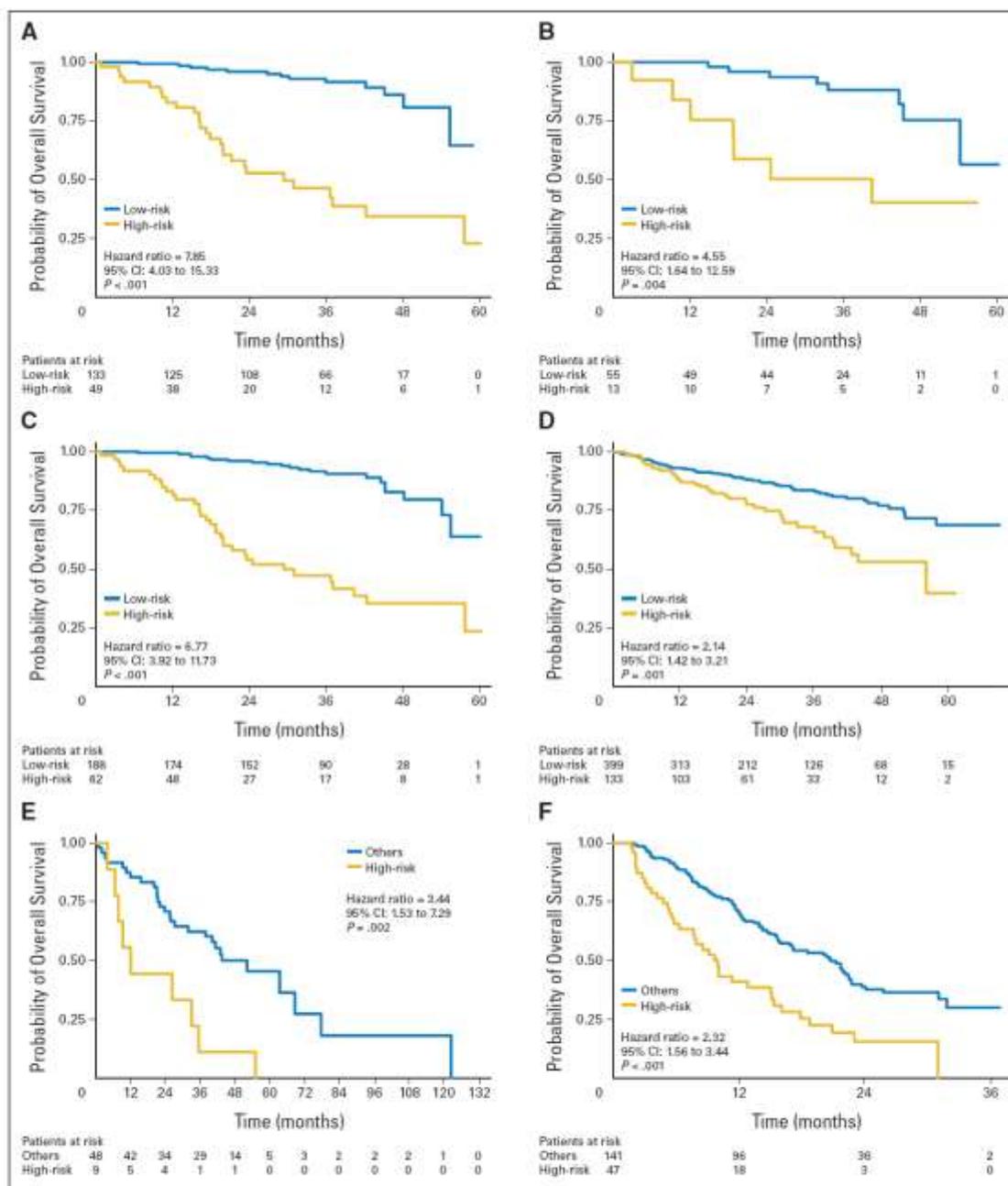
### External Validation Data Sets

Affymetrix (Santa Clara, CA) gene expression data were obtained from University of Arkansas School of Medical Sciences (UAMS) data set of 532 newly diagnosed patients (accession number GSE2658),<sup>11</sup> from Mayo Clinic data set of 57 newly diagnosed patients (accession number GSE6477),<sup>12,13</sup> and

Table 1. Patient Characteristics

Characteristic	Training Population (n = 182)	Test Population (n = 68)	P
Age, years			.57
Mean	55.5	56.1	
SD	6.9	7.3	
S $\beta$ 2M, mg/L			.56
Mean	4.6	5	
SD	5.4	4.2	
Platelets, 10 <sup>9</sup> /L			.36
Mean	261	246	
SD	96	115	
Hemoglobin, g/dL			.43
Mean	11.2	10.4	
SD	6.9	2.1	
Serum albumin, g/L			.63
Mean	38.8	39.3	
SD	6.5	7.8	
Del(13)			.50
No. of patients	89	30	
Total patients	182	68	
t(4;14)			.17
No. of patients	23	4	
Total patients	167	63	
t(11;14)			.14
No. of patients	37	8	
Total patients	172	63	
Follow-up, months			.84
Mean	36	35	
SD	13	15	
3-year survival, %			.92
Mean	79.7	80.6	
SD	3.3	5.3	
ISS, No. of patients			.32
1	76	20	
2	55	24	
3	40	16	

Abbreviations: SD, standard deviation; S $\beta$ 2M, serum  $\beta_2$ -microglobulin; ISS, International Staging System.



**Fig 1.** Development and validation of the Intergroupe Francophone du Myélome (IFM) 15-gene model. (A) Training group (IFM data set). (B) Test group (IFM data set). (C) All patients (IFM data set). (D) Validation (University of Arkansas School of Medical Sciences data set). (E) Validation (Mayo Clinic data set). (F) Validation (Mulligan's data set,<sup>14</sup> bortezomib alone).

from Millennium Pharmaceuticals data set of 264 patients who had experi-

enced relapse (accession number GSE9782).<sup>14</sup> Validation procedure applied to these independent data sets is presented in the Appendix.

#### Gene Set Enrichment Analysis

Gene Set Enrichment Analysis software v2.0.1 was used for the analysis.<sup>15</sup> Details of this procedure are presented in the Appendix.

## RESULTS

### Gene Expression–Based Model for Predicting Survival in MM

Gene expression profiles were generated for 250 newly diagnosed patients enrolled in the IFM 99 trials (Table 1) using single-channel cDNA arrays. Univariate Cox analysis was performed on the 7,508 gene probes to identify genes associated with survival in the training set of 182 patients. The 15 most stable genes were used to construct a survival model (Appendix Table A2, online only). Principal component analysis was performed on the 15-gene list. The first principal component was computed and used as an expression risk score for each patient. The cases were ranked according to their score: quartiles 1 and 2 defined very low risk, quartiles 1, 2, and 3 defined low risk, and finally quartile 4 delineated high-risk patients. The IFM 15-gene model was highly predictive of survival in IFM data set (Figs 1A through 1C). The rates of survival at 3 years in low- and high-risk groups in our whole cohort were 90.5% (95% CI, 85.6% to 95.3%) and 47.4% (95% CI, 33.5% to 60.1%), respectively. The 15-gene high-risk signature has been validated in three independent data sets comprising 853 newly diagnosed and relapsed myeloma patients (Figs 1D and 1F and Appendix). When competed with the UAMS 17-gene prognostic model,<sup>11</sup> the IFM model does not remain a significant independent variable in the UAMS TT2 data sets and does not identify the early disease-related deaths in the UAMS TT3 data set (Table 2 and Appendix Table A3, online only)<sup>11</sup>; however, our 15-gene model remains a significant independent variable in the unrelated (non-IFM and non-UAMS) data sets examined (Table 2 and Appendix).<sup>12–14</sup> To cross-validate the results, the UAMS 17-gene model was applied to the IFM data set. Despite differences in

microarray platforms (Affymetrix v academic cDNA arrays) and in clinical trials (single center v multiple centers), univariate analysis revealed that the UAMS model successfully identifies high risk in patients with myeloma enrolled in IFM trials ( $P = .001$ ; hazard ratio, 2.43; Appendix), and when adjusted to the IFM model, the UAMS signature is near statistical significance ( $P = .075$ ).

### Comparison of Our Gene Expression–Based Survival Predictor and the Most Important Prognostic Variables

Univariate and multivariate Cox proportional hazards analyses were performed on the entire cohort to determine the relative prognostic values of known prognostic variables and our model for OS determination (Table 3). Other than the 15-gene risk categories,  $\text{S}\beta\text{2M} \geq 5.5$  mg/L, platelets less than  $130 \times 10^9/\text{L}$ ,  $\text{del}(13)$ , and  $\text{t}(4;14)$  were correlated with survival in univariate analysis.

In the multivariate analysis, estimation of hazard ratio for death was 6.06 ( $P < .001$ ) in the high-risk group, indicating that the 15-gene model was by far the most powerful independent prognostic factor. Not surprisingly, the other variables retained in the analysis were  $\text{S}\beta\text{2M} \geq 5.5$  mg/L and  $\text{t}(4;14)$ . Actually,  $\text{S}\beta\text{2M}$  value was recently confirmed as the strongest clinical prognostic variable that delineated high-risk group (ISS 3) by the ISS system<sup>2</sup> and was also identified, with  $\text{t}(4;14)$ , as an independent powerful prognostic factor in a survival model built with a large series of patients enrolled in the IFM clinical trials.<sup>5</sup>

Kaplan and Meier analysis of the 250 patients with myeloma according to 15-gene risk score showed that  $\text{S}\beta\text{2M} \geq 5.5$  mg/L and/or  $\text{t}(4;14)$  identify subsets with significant different survival among low- and high-risk groups (Fig 2). These results indicated that the 15-gene signature and established prognostic parameters marked distinct biologic features associated with survival. The combination of these three independent prognostic entities provided an accurate tool to identify the highest risk group (12.4%) with a 3-year rate of survival of only 34% (95% CI, 17% to 52%; Appendix Table A4, online only).

**Table 2.** Multivariate Analysis of IFM and UAMS Risk Models Applied to Three Independent Data Sets

Predictor	Data Set	Adjusted Cox HR	95% CI	P
IFM risk model	UARK 99-026 (TT2)	1.35	0.83 to 2.21	.26
UAMS risk model	UARK 99-026 (TT2)	4.37	2.64 to 7.24	< .001
IFM risk model	UARK 03-033 (TT3)	0.99	0.30 to 3.18	.97
UAMS risk model	UARK 03-033 (TT3)	5.21	1.64 to 16.58	< .001
IFM risk model	TT2 + TT3	1.24	0.78 to 1.95	.36
UAMS risk model	TT2 + TT3	4.69	2.95 to 7.46	< .001
IFM risk model	Mayo Clinic cohort	2.63	1.15 to 5.99	.021
UAMS risk model	Mayo Clinic cohort	2.65	1.17 to 6.01	.019
IFM risk model	APEX, SUMMIT, CREST	1.92	1.35 to 2.72	< .001
UAMS risk model	APEX, SUMMIT, CREST	2.63	1.75 to 3.93	< .001
IFM risk model	APEX, SUMMIT, CREST (bortezomib)	1.96	1.30 to 2.96	.001
UAMS risk model	APEX, SUMMIT, CREST (bortezomib)	2.39	1.48 to 3.87	< .001
IFM risk model	APEX (Dex)	1.65	0.81 to 3.37	.189
UAMS risk model	APEX (Dex)	3.43	1.62 to 7.28	.001

Abbreviations: IFM, Intergroupe Francophone du Myélome; UAMS, University of Arkansas School of Medical Sciences; HR, hazard ratio; UARK, University of Arkansas; APEX, Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions; Dex, dexamethasone.

**Table 3.** Univariate and Multivariate Analyses for Overall Survival in the IFM Data Set

Factor	Univariate Analysis (log-rank test)			Multivariate Analysis (stepwise Cox model)		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Age $\geq 60$ v < 60 years	1.19	0.67 to 2.11	.55	—	—	—
Sex, male v female	0.94	0.55 to 1.61	.82	—	—	—
Non IgA v IgA	1.30	0.70 to 2.44	.41	—	—	—
Serum albumin, < 35 v $\geq 35$ g/L	1.54	0.83 to 2.95	.17	—	—	—
S $\beta$ 2M, mg/L						
$\geq 5.5$ v < 3.5	1.37	0.65 to 2.87	.40	—	—	—
$\geq 5.5$ v < 3.5	2.80	1.55 to 5.06	< .001	—	—	—
$\geq 5.5$ v < 5.5	—	—	—	2.69	1.36 to 5.32	.004
Platelets < 130 v $\geq 130$ 10 <sup>9</sup> /L	4.73	2.26 to 9.91	< .001	—	—	—
Del(13), yes v no	2.20	1.26 to 3.83	.006	—	—	—
t(4;14), yes v no	2.78	1.41 to 5.50	.003	2.34	1.08 to 5.10	.032
IFM 15-gene model, high risk v low risk	6.77	3.92 to 11.73	< .001	6.06	3.12 to 11.76	< .001

Abbreviations: IFM, Intergroupe Francophone du Myélome; HR, hazard ratio; IgA, immunoglobulin A; S $\beta$ 2M,  $\beta_2$ -microglobulin.

### Correlation Between Extreme-Risk Entities and FISH Abnormalities

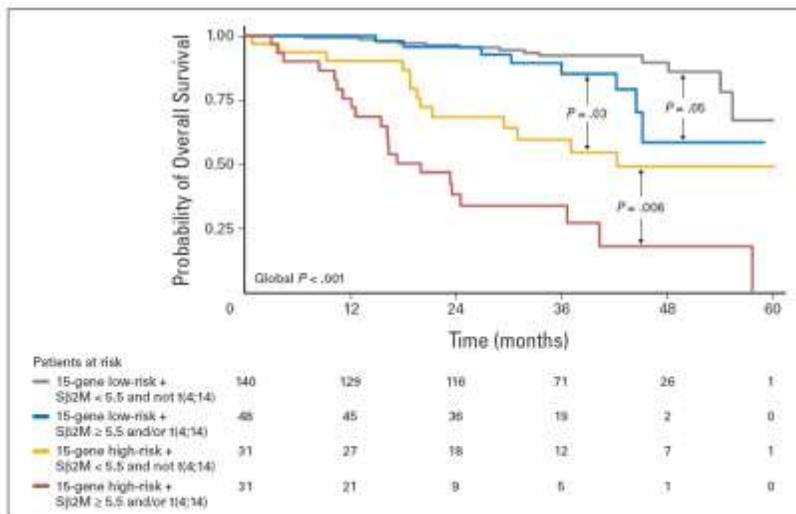
The high-risk group (15-gene model quartile 4) was significantly associated with deletion of 13q, deletion of 17p, gain of 1q, and translocation t(4;14), whereas the very low-risk group (15-gene model quartiles 1 and 2) was significantly correlated with hyperdiploid status determined by FISH<sup>1</sup> (Appendix Table A5, online only).

### Biology Associated With Extreme-Risk Entities

To investigate biologic features shared by extreme-risk groups, we performed gene set enrichment analysis, a robust computational method that determines whether an a priori defined set of genes shows statistically significant, concordant differences between both extreme-risk groups (Appendix Table A6, online only).<sup>15</sup>

The algorithm identified a large number of significant gene sets elevated in high-risk patients. We first selected the top 15 showing a normalized enrichment score of greater than 2, then we extracted the core genes (leading-edge subset) that contributed the most to the enrichment score in each gene set. We selected the genes shared by at least three leading-edge subsets to define a high-risk enriched signature (Fig 3).

The list of the genes contains a large array of cell-cycle regulated genes<sup>16</sup> that are involved in the basic and essential cell cycle processes, such as cell-cycle control, DNA replication, DNA repair, DNA packaging, mitosis, and spindle-assembly checkpoint (SAC) (Appendix Table A7, online only). A striking feature of this signature was the overexpression of key regulators that normally maintain faithful segregation of chromosomes,<sup>17</sup> such as MAD2 and BUBR1, two of the



**Fig 2.** Prognostic impact of the Intergroupe Francophone du Myélome 15-gene model, serum  $\beta_2$ -microglobulin (S $\beta$ 2M)  $\geq 5.5$  mg/L and t(4;14).

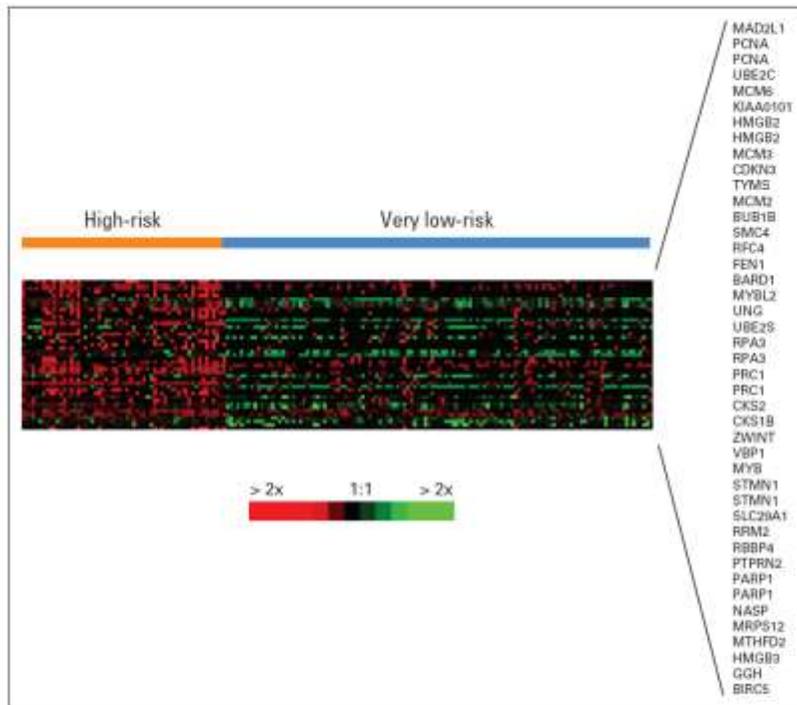


Fig 3. Heat map showing normalized expression levels of the high-risk enriched signature for extreme-risk multiple myeloma.

four key members of the mitotic checkpoint complex<sup>16,19</sup>; ZWINT, a linker between mitotic checkpoint signaling and the structural kinetochore<sup>20</sup>; survivin, a member of chromosome passenger complex required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly<sup>21</sup>; UBE2C, an ubiquitin-conjugating enzyme involved in the termination of SAC signal<sup>22</sup>; PRC1, a microtubule-associated protein that targets PLK1 to the central spindle at the metaphase-anaphase transition<sup>23</sup>; PARP1, a multifunctional enzyme that catalyzes the formation of poly(ADP-ribose) polymers on acceptor proteins (including BUB3, a component of the mitotic checkpoint complex,<sup>24</sup> and Aurora-B, a kinase of the chromosome passenger complex)<sup>25</sup>; STMN1/OP18, a microtubule-destabilizing protein inhibited by Aurora-B during the process of spindle assembly<sup>26</sup>; and SMC4, a member of the condensin complex that plays a critical role in mitotic chromosome segregation.<sup>27</sup>

These results suggest that malfunction of the mitotic network activity in MM cells from aggressive disease could maintain a moderate rate of chromosomal instability (CIN) and aneuploidy,<sup>28</sup> a hallmark of MM.<sup>29</sup> To test this hypothesis, we compared the high-risk enriched signature with a 70-gene signature of CIN associated with poor clinical outcome in six cancer types, including lymphoma, lung adenocarcinoma, mesothelioma, medulloblastoma, glioma, and breast cancer.<sup>30</sup> There was significant overlap of 11 genes, including *PRC1*, *MAD2L1* (which encodes MAD2), and *RFC4*, with known functional association with CIN (Appendix Table A7). In addition, CIN70 signature was a significant predictor of OS in our data set ( $P = .03$ ) but lost its significance when adjusted to the 15-gene model ( $P = .71$ ). These results support our hypothesis that CIN was

associated with adverse prognosis in MM but was less powerful than the 15-gene signature for risk stratification. Because many of the high-risk enriched genes are cell-cycle regulated, we first compared functional categories represented in this signature with those found in previously described proliferation index (PI) signatures known to be associated with poor prognosis in various type of tumors,<sup>31</sup> including MM.<sup>32</sup> We found an overlap of 12 genes, with a vast majority of them (eight of 12) involved in DNA replication and maintenance, whereas only two of 12 are involved in the mitotic process and its control (Appendix Table A7). Then we evaluated the prognostic impact of PI signatures adjusted or not to the 15-gene signature in our cohort and in UAMS cohort. PI signatures were generally significant predictors of survival, but in both cohorts evaluated, the 15-gene signature remained significant in a Cox model given the PI signatures (Appendix and Appendix Table A8, online only). These data showed that our 15-gene model is not simply a surrogate measure of tumor cell proliferation index.

In very low-risk patients, the Gene Set Enrichment Analysis algorithm revealed only three significant gene sets, thus reflecting their complex biology (Appendix Table A6). Interestingly, two of the three gene sets are related to hyperdiploidy in MM. The first set included 20 enriched genes of the top 50 overexpressed genes that categorized the hyperdiploid group among MM patients.<sup>32</sup> Although the third set identified eight genes (including *EEF2*, *EIF3S7*, *EIF4B*, *RPL5*, *RPL6*, *RPL17*, *RPL22*, and *RPS9*) involved in protein biosynthesis, such signature was recently reported as a common feature among hyperdiploid MM patients.<sup>12</sup> Our results suggest that protein biosynthesis gene expression signature predominates in patients with good prognosis.

## DISCUSSION

Despite providing valuable prognostic information, ISS and cytogenetic abnormalities have a limited ability to predict individual patient outcomes. Using gene expression profiling in a top-down supervised approach, we developed a 15-gene model that accurately predicts survival in newly diagnosed patients with MM treated with high-dose therapy. High-risk patients have a 6.8-fold hazard ratio (95% CI, 3.92 to 11.73;  $P < .001$ ) of death compared with low-risk patients.

The IFM 15-gene model improves ISS prognostication. High-risk patients according to ISS staging (representing 22.5% of the cases) had a median OS of 45 months, whereas high-risk patients according to the 15-gene model had a median OS of 31 months. The 15-gene model is also more discriminating than the FISH model<sup>9</sup> for stratifying MM patients according to survival. Very low-risk patients (approximately 50% of the cases) defined either by our model or by the absence of t(4;14) and del(17p) with low S $\beta$ 2M level had a rate of survival at 3 years of 95% and 88%, respectively. Similarly, high-risk patients defined either by our model (25% of the cases) or defined by a 17p(≥ 60%) and/or a t(4;14) (approximately 20% of the cases) had median OS of 31 months and 37 months, respectively.

IFM 15-gene and UAMS 17-gene models, when applied to their respective data sets, are extremely powerful prognostic factors, with hazard ratio superior to 5 in high-risk patients. Despite difficulties in performing cross-validation because of our academic cDNA arrays that cover half of the genome and that generate data sets not readily available, we found that both gene signatures remain powerful prognostic factors with hazard ratio greater than 2; when compared with each other, they do not remain independent (IFM model,  $P = .26$ ) or near independent (UAMS model,  $P = .07$ ). Finally, when applied to independent data sets, both the 15-gene and the 17-gene models seem to be equivalent and independent in newly diagnosed ( $P = .02$ ) and relapsed myeloma ( $P \leq .001$ ). Thus combination of these models is able to dissect the patients experiencing relapse who do not benefit from bortezomib (median OS, 5.3 months) compared with patients having one (median OS, 11.2 months) or no high-risk signatures (median OS, 21.7 months).

In addition to its strong prognostic interest, our model defines two subpopulations with extreme risks and thereby provides the opportunity to better understand the molecular mechanisms underlying resistance to treatment. The very low-risk group is a heterogeneous entity enriched in two hyperdiploid signatures<sup>11,12</sup> that contain more than 50% of hyperdiploid patients (defined by three-probe FISH analysis). In contrast with the study of Chng et al,<sup>12</sup> the protein biosynthesis-enriched signature is apparently not restricted to the predicted hyperdiploid low-risk patients; we are currently analyzing genome-wide genetic alterations in low-risk patients by using single nucleotide polymorphism arrays to clarify their genetic status (unpublished data).

## REFERENCES

- Bataille R, Durie BG, Grenier J, et al: Prognostic factors and staging in multiple myeloma: A reappraisal. *J Clin Oncol* 4:80-87, 1986
- Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al: International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23:3412-3420, 2005
- Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al: Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: The experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 109:3489-3495, 2007
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al: The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346:1937-1947, 2002
- Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, 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* 99:2185-2191, 2002
- Magrangeas F, Nasser V, Avet-Loiseau H, et al: Gene expression profiling of multiple myeloma reveals molecular portraits in relation to the pathogenesis of the disease. *Blood* 101:4998-5006, 2003
- Nguyen C, Rocha D, Granjeaud S, et al: Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics* 29:207-216, 1995
- Bernard K, Auphan N, Granjeaud S, et al: Multiplex messenger assay: Simultaneous, quantitative measurement of expression of many genes in

Patients with high-risk MM are characterized by the overexpression of genes involved in multiple phases of the entire cell cycle that is a common feature in cancer cells.<sup>31</sup> The novelty of our findings is the specific enrichment of mitotic-phase members in patients with aggressive disease. Overexpression of these genes was described in various human cancers and was correlated with poor prognosis. The putative impact of their overexpression in plasma cell tumorigenesis is supported by a recent study reporting that MAD2 overexpression in mice leads to CIN (characterized by numerical and structural abnormalities) and tumorigenesis.<sup>32</sup> However, because overexpressed genes of the high-risk enriched signature are implicated in cellular processes other than mitotic phase, such as apoptosis, DNA replication, DNA repair, transcription regulation, and cellular transport, one cannot exclude that these mechanisms could also contribute to tumor initiation and progression in MM.

Our hypothesis that the SAC activity network is perturbed in plasma cells of high-risk patients, thereby maintaining mild CIN that will facilitate tumorigenesis and drug resistance, leads to a targeted therapeutic model in which SAC inactivation might be an efficient way to provoke plasma cell death. This hypothesis is reinforced by a recent study showing that an Aurora kinase inhibitor (VX-680) induced apoptosis of plasma cells from aggressive disease.<sup>34</sup>

In conclusion, this work provides a powerful tool for identifying high risk in patients with newly diagnosed and relapsed myeloma, as well as subgroups that do not benefit from new agent such as bortezomib, and a rational basis for treating these patients with targeted antimetabolites.

## AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Conception and design:** Olivier Decaux, Florence Magrangeas, Pascal Jézéquel, Philippe Moreau, Régis Bataille, Loïc Campion, Hervé Avet-Loiseau, Stéphane Minvielle  
**Provision of study materials or patients:** Michel Attal, Jean-Luc Harousseau, Philippe Moreau, Hervé Avet-Loiseau  
**Collection and assembly of data:** Olivier Decaux, Laurence Lodé, Florence Magrangeas, Wilfried Gouraud, Stéphane Minvielle  
**Data analysis and interpretation:** Olivier Decaux, Laurence Lodé, Florence Magrangeas, Catherine Charbonnel, Régis Bataille, Loïc Campion, Hervé Avet-Loiseau, Stéphane Minvielle  
**Manuscript writing:** Loïc Campion, Hervé Avet-Loiseau, Stéphane Minvielle  
**Final approval of manuscript:** Olivier Decaux, Loïc Campion, Hervé Avet-Loiseau, Stéphane Minvielle

## Molecular Prognosis in Multiple Myeloma

the context of T cell activation. *Nucleic Acids Res* 24:1435-1442, 1996

9. Bertucci F, Bernard K, Loriod B, et al: Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum Mol Genet* 8:1715-1722, 1999

10. Simon R, Peng A: BRB-ArrayTools. Bethesda, MD, 2003. <http://inis.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>

11. Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington B, et al: A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood* 109:2276-2284, 2007

12. Chng WJ, Kumar S, Vanwier S, et al: Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Res* 67:2982-2989, 2007

13. Chng WJ, Kuehl WM, Bergsagel PL, et al: Translocation t(4;14) retains prognostic significance even in the setting of high-risk molecular signature. *Leukemia* 22:459-461, 2008

14. Mulligan G, Mitsades C, Bryant B, et al: Gene expression profiling and correlation with outcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood* 109:3177-3189, 2007

15. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al: Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545-15550, 2005

16. Whitfield ML, Sharlock G, Saldanha AJ, et al: Identification of genes periodically expressed in the

human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell* 13:1977-2000, 2002

17. Musacchio A, Salmon ED: The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:379-3793, 2007

18. Li R, Murray AW: Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66:519-531, 1991

19. Hoyt MA, Totts L, Roberts BT: S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66:507-517, 1991

20. Kops GJ, Kim Y, Weaver BA, et al: ZW10 links mitotic checkpoint signaling to the structural kinetochore. *J Cell Biol* 169:49-60, 2005

21. Sampath SC, Ohi R, Leitmann O, et al: The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* 118:197-202, 2004

22. Reddy SK, Rape M, Margansky WA, et al: Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature* 446:921-925, 2007

23. Neef R, Grunberg U, Kopajtich R, et al: Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nat Cell Biol* 9:436-444, 2007

24. Saxena A, Saffery R, Wong LH, et al: Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosylated). *J Biol Chem* 277:26921-26926, 2002

25. Monaco L, Kotthar-Seetharam U, Loury R, et al: Inhibition of Aurora-B kinase activity by poly(ADP-

ribosylation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14244-14248, 2005

26. Gadea BB, Ruderman JV: Aurora B is required for mitotic chromatin-induced phosphorylation of Op18/Stathmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4493-4498, 2006

27. Losada A, Hirano T: Dynamic molecular linkers of the genome: The first decade of SMC proteins. *Genes Dev* 19:1269-1287, 2005

28. Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW: On the road to cancer: Aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5:773-785, 2005

29. Zandecki M, Lai JL, Facon T: Multiple myeloma: Almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol* 94:217-227, 1995

30. Carter SL, Eklund AC, Kohane IS, et al: A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* 38:1043-1048, 2006

31. Whitfield ML, George LK, Grant GD, et al: Common markers of proliferation. *Nat Rev Cancer* 6:99-106, 2006

32. Zhan F, Huang Y, Colla S, et al: The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 106:2020-2029, 2006

33. Sotillo R, Hernando E, Diaz-Rodriguez E, et al: Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell* 11:9-23, 2007

34. Shi Y, Reiman T, Li W, et al: Targeting aurora kinases as therapy in multiple myeloma. *Blood* 109:3915-3921, 2007

### Acknowledgment

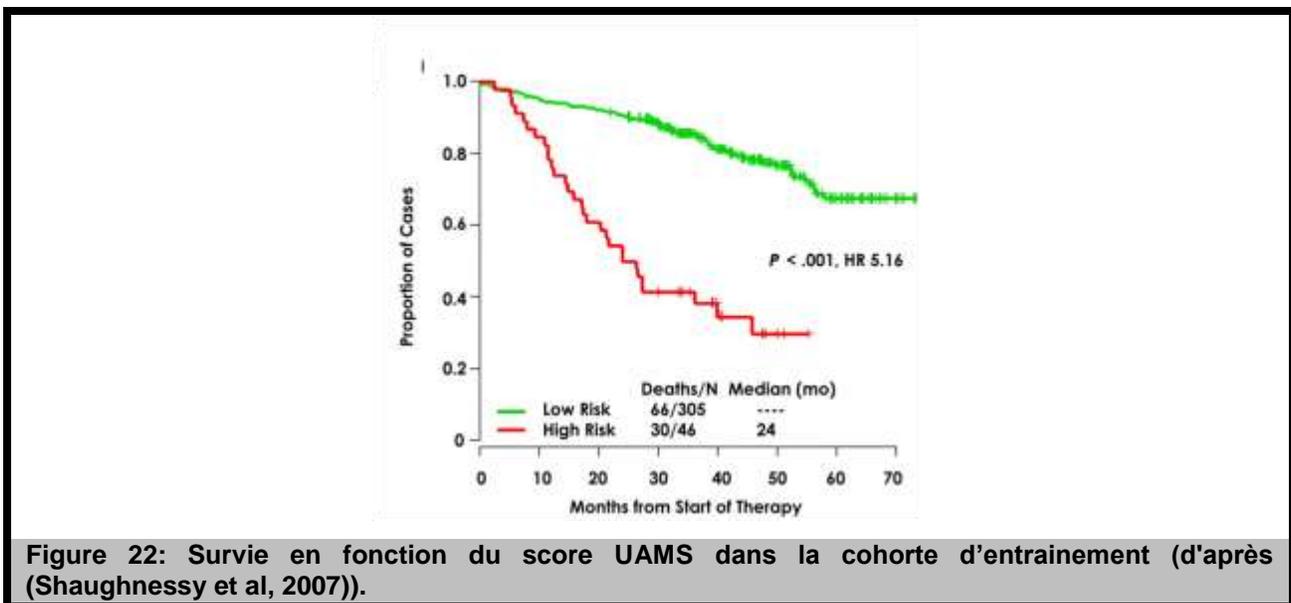
We thank Magali Martin, Emilie Ollivier, and Nathalie Roi for excellent technical expertise.

### Appendix

The Appendix is included in the full-text version of this article, available online at [www.jco.org](http://www.jco.org). It is not included in the PDF version (via Adobe® Reader®).

### V.7.2 Score UAMS (University of Arkansas for Medical Sciences)

A la même période, Shaughnessy (Shaughnessy et al, 2007) a analysé les données des patients des deux cohortes du papier de Zhan (Zhan et al, 2006) pour rechercher des marqueurs prédictifs. Tous les patients ont été inclus dans un protocole comportant au moins un traitement d'induction et une intensification avec double autogreffe de moelle osseuse. Contrairement à l'étude de Zhan qui avait fait une analyse non supervisée, Shaughnessy a recherché les gènes corrélés à la survenue précoce d'un décès (24 patients) par utilisation du log rank test sur les quartiles d'expression des gènes. Soixante dix gènes qui ont des expressions extrêmes entre les deux groupes de patients ont été ainsi identifiés : 51 gènes surexprimés et 19 sous exprimés. Un score de risque tenant compte de l'expression de chacun de ces gènes a été établi (score UAMS). La répartition des patients montrait qu'un sous groupe représentant 13% des patients avait un score élevé (patient à haut risque). La survie globale et la survie sans événement de ce groupe de patients étaient diminuées. La survie sans événement à 5 ans des patients à haut risque était estimée à 18% contre 60% pour les patients à faible risque ( $p < 0,001$  - HR 4,51). La survie globale à 5 ans était respectivement de 18% et 78% ( $p < 0,001$  - HR 5,16) (figure 22).

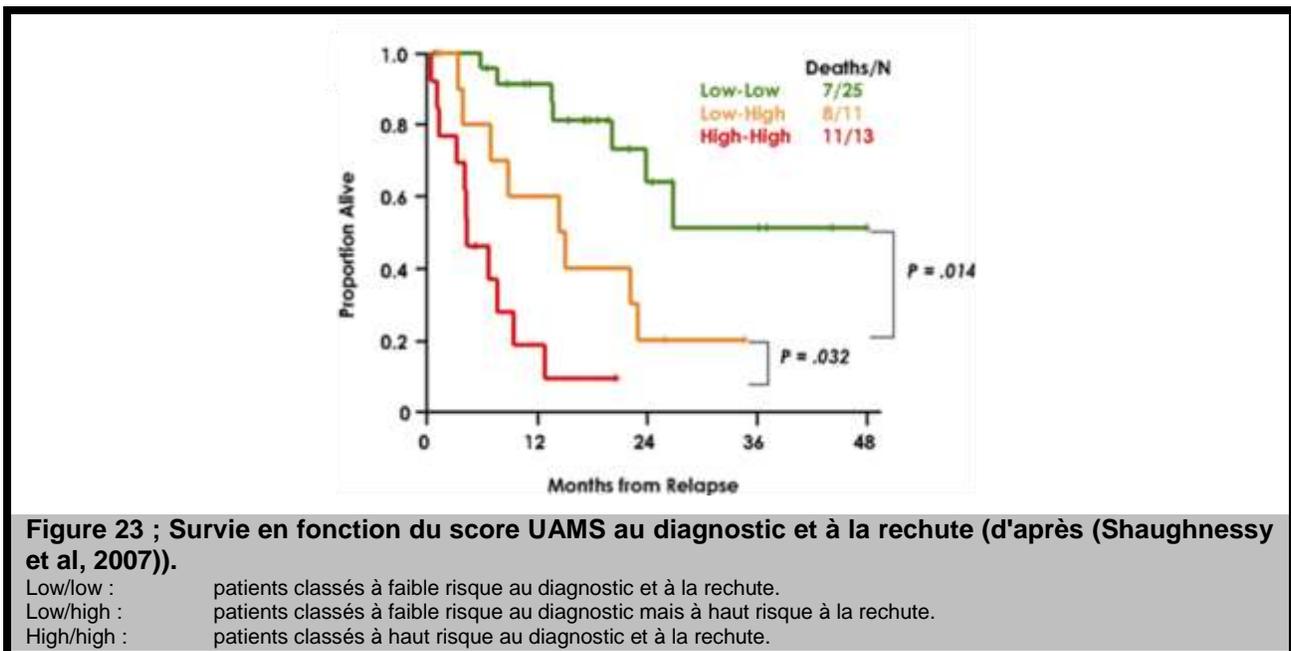


En analyse non supervisée des 256 patients de la cohorte d'entraînement et de 22 plasmocytes normaux, 14 MGUS et 38 lignées, les myélomes de haut risque étaient proches de lignées alors que ceux de faible risque étaient plus proches des MGUS, ce qui confirmait les données des

études précédentes. Le score a été validé dans la cohorte de validation où 12,1% des patients étaient identifiés comme à haut risque. Ces patients avaient également une survie globale et EFS diminuée par rapport aux patients à faible risque.

Dans les deux cohortes, les patients à haut risque étaient plus fréquemment associés à des facteurs de mauvais pronostic. (augmentation de la  $\beta 2m$ , de la CRP, des LDH, insuffisance rénale, délétion du chromosome 13 en FISH, anomalies caryotypiques,...). En analyse multivariée comprenant l'ISS et les translocations à haut risque, le score de risque défini restait associé à la survie globale et à l'EFS. Par ailleurs, il était le seul paramètre prédictif de la durée de réponse complète.

Un des intérêts de cette étude est d'avoir étudié la valeur prédictive du score pronostique chez des patients en rechute. Cinquante et un patients de la cohorte d'entraînement ont bénéficié d'une analyse au diagnostic et à la rechute. La fréquence des patients classés à haut risque était bien plus importante (39 patients - 76%) à la rechute qu'à l'évaluation diagnostique. Les patients ayant un score de faible risque aux deux évaluations avaient une survie globale prolongée après rechute (figure 23).



Les auteurs ont étudié la localisation chromosomique des 70 gènes pour rechercher une corrélation avec des gains ou pertes de chromosome spécifique. Ils ont observé que 21 (30%) des gènes étaient situés sur le chromosome 1. La majorité des gènes surexprimés étaient sur le bras long 1q et les gènes sous exprimés sur le bras court 1p. La perte du 1p et le gain du 1q semblaient donc caractéristiques des patients à haut risque. L'impact des gains /amplifications du 1q avait déjà été décrite par plusieurs auteurs en analyse cytogénétique par FISH (Hanamura et al, 2006) ou par CGH arrays (Carrasco et al, 2006). L'implication du chromosome 1 est cohérente avec des données antérieures qui avaient montré que la progression de la maladie était associée à une augmentation du nombre de copies et du pourcentage de cellules ayant une amplification du 1q (Hanamura et al, 2006).

Les auteurs ont ensuite identifié les gènes les plus discriminants dans cette liste de 70 gènes et ont pu ainsi déterminer un groupe de 17 gènes portant l'information. Un score basé sur l'expression de ces 17 gènes (score UAMS) a été testé sur les deux cohortes et permettait un classement identique au score basé sur 70 gènes de 97,7 % des patients de la cohorte d'entraînement et de 94,5% de la cohorte de validation. Le lien avec l'EFS et la survie était confirmé avec l'analyse basée sur 17 gènes.

En comparaison avec les 7 groupes antérieurement décrits (Zhan et al, 2006), les patients à haut risque se répartissaient dans tous les groupes sauf le CD-2 mais étaient plus fréquemment associés au PR. Une analyse des 50 patients ayant une t(4 ;14) montrait que le score UAMS séparait les patients en deux groupes ayant des survies très différentes. Par ailleurs, Chng (Chng et al, 2008) a repris les données de la cohorte d'entraînement de Shaugnessy et montré que la présence d'une t(4 ;14) permettait de séparer les patients à haut risque mais pas les patients à faible risque en deux groupes ayant des survies différentes. Compte tenu de ces données, il proposait une classification combinant le score UAMS et la t(4;14).

Le score UAMS est performant au diagnostic mais aussi à la rechute et témoigne donc probablement de l'évolution de la maladie. L'implication du chromosome 1 est cohérente avec des données antérieures qui avaient montré que la progression de la maladie était associée à une augmentation du nombre de copies et du pourcentage de cellules ayant une amplification du 1q.

### **V.7.3 Impact des nouveaux traitements du myélome sur la valeur prédictive du score UAMS**

Une des difficultés est que les prédicteurs déterminés peuvent être dépendants des traitements reçus par les patients. Ainsi, le caractère prédictif de la délétion du 13 et la t(4 ;14) semble être dépassé par le bortezomib (Jagannath et al, 2007; Sagaster et al, 2007). Zhan a testé la pertinence du score 17 gènes sur une cohorte de 156 patients en rechute inclus dans le protocole APEX comparant un traitement par bortezomib à un traitement par dexaméthasone (Zhan et al, 2008). Le score UAMS classait 21 (13,5%) patients à haut risque. La survie à un an de ces patients était plus faible (32% contre 74% / p=0,001 – HR 2,52). Le score a été validé également sur les deux bras de traitement et permettait donc de prédire la survie, quelque soit le traitement reçu par les patients. Cependant, dans cette analyse, on est surpris du faible nombre de patients classés à haut risque comparativement au taux élevé dans la population en rechute de Shaughnessy (Shaughnessy et al, 2007).

### **V.7.4 Poids des marqueurs moléculaires par rapport aux marqueurs pronostiques déjà décrits**

Shaughnessy a comparé en analyse multivariée l'impact de différents marqueurs biologiques ou génétiques sur la survie globale et l'EFS dans une cohorte de 220 patients inclus dans le protocole TT2 (Shaughnessy et al, 2007). Les marqueurs prédictifs indépendants de la survie étaient : le score UAMS, les anomalies cytogénétiques, l'amplification du chromosome 1q et l'existence de lésions osseuses en IRM. Pour l'EFS, les facteurs prédictifs étaient : le score UAMS, le taux de  $\beta$ 2m, l'amplification du chromosome 1q et l'existence de lésions osseuses en IRM. En combinant le score UAMS et la recherche d'une amplification 1q en FISH, les auteurs identifiaient 3 groupes de patients. La survie des patients n'ayant aucun des facteurs de mauvais pronostic avaient une survie globale à 3 ans (92%) supérieure à celle des patients ayant uniquement une amplification 1q (78%) ou ayant un score UAMS élevé (43%) (figure 24).

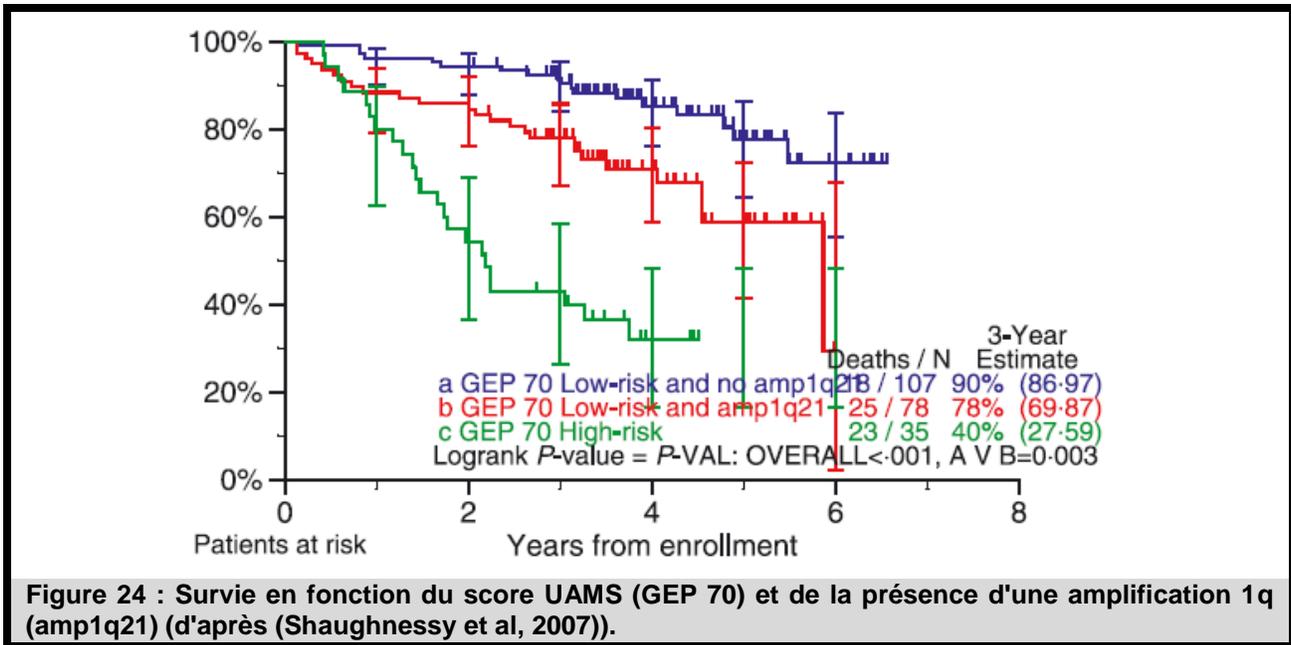


Figure 24 : Survie en fonction du score UAMS (GEP 70) et de la présence d'une amplification 1q (amp1q21) (d'après (Shaughnessy et al, 2007)).

Ces résultats démontrent que la recherche d'une amplification 1q et le score UAMS apportent des informations différentes et que le score UAMS n'est pas un simple témoin de l'amplification 1q.

### V.7.5 Prédiction de la réponse au bortezomib

Compte tenu de l'augmentation de la survie des patients avec l'apparition des nouvelles drogues et de la possibilité de proposer des traitements de rattrapage efficace, il devient difficile d'étudier la survie. Il devient plus pertinent de chercher à prédire la réponse au traitement afin de développer des stratégies de traitement personnalisées. Cette approche paraît d'autant plus appropriée que plusieurs travaux ont bien montré que la réponse au traitement est prédictive de la survie (cf chapitre II.5). Par ailleurs, les analyses de cytogénétiques récentes montrent que l'impact pronostique de certaines anomalies cytogénétiques décrites dans des cohortes de patients traités par chimiothérapie conventionnelle ou autogreffe n'est pas confirmé sur des cohortes de patients traités avec les nouveaux traitements du myélome (Jagannath et al, 2007). Ces nouveaux traitements doivent donc faire l'objet d'études spécifiques.

Mulligan a publié une étude dont l'objectif était d'identifier des marqueurs moléculaires prédictifs de la réponse au bortezomib (Mulligan et al, 2007). Il s'agit d'une étude dont l'un des buts était de tester la faisabilité d'études de pharmacogénomique pour explorer et prédire la

réponse au traitement. En d'autres termes, la question posée était : Les méthodes utilisées dans les études de profils d'expression génique pour définir des scores prédictifs de la survie peuvent elles être appliquées dans l'analyse de la réponse au traitement ?

Les patients étudiés étaient inclus dans 4 essais de phase II ou III avec du bortezomib en rechute après au moins une ligne de chimiothérapie. Le bortezomib était donné monothérapie. Dans un des essais (APEX), les patients étaient randomisés en deux bras comparant bortezomib et dexaméthasone en monothérapie. Les critères de réponse étaient ceux définis par l'EBMT. Les essais différaient en terme de nombre de lignes de traitement déjà reçues et de temps par rapport au diagnostic initial. Les échantillons provenaient de 89 centres dans 12 pays. Cent quatre vingt huit patients traités par bortezomib et 56 par dexaméthasone ont été inclus.

Les données de 2 essais avec traitement par bortezomib en monothérapie ont été analysées par bootstrap pour identifier les gènes associés à la réponse au traitement (quelque soit la qualité de la réponse, y compris réponse mineure). A partir de ces gènes, un prédicteur de la réponse a été développé puis testé sur une cohorte indépendante (patients inclus dans le protocole APEX). Le prédicteur permettait de classer correctement comme répondeurs ou non répondeurs 75% des patients (sensibilité 92%, spécificité 33% p 0,033) dans le bras bortezomib mais seulement 57% (sensibilité 79%, spécificité 32%, p=0,53) dans le bras dexaméthasone. L'analyse des profils d'expression génique avait donc permis de développer un prédicteur de la réponse spécifique au bortezomib, validé sur une cohorte indépendante.

Les auteurs ont utilisé les mêmes méthodes pour identifier un prédicteur de survie. Ce prédicteur a ensuite été testé et validé sur la cohorte « APEX ». Les patients étaient classés en haut risque ou faible risque sur la base de ce prédicteur. Dans les deux bras de traitement, la survie des patients à faible risque était meilleure. Ce prédicteur de survie était indépendant de l'ISS. Les deux prédicteurs décrits dans cette étude (survie et de réponse) n'avaient pas de gènes communs.

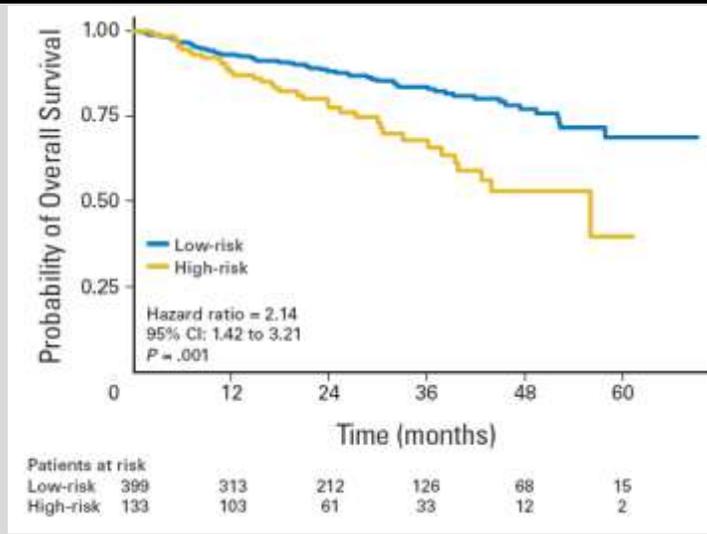
#### **V.7.6 Validation externe des scores prédictifs sur des cohortes indépendantes.**

La mise à disposition des données d'expression sur Internet autorise l'utilisation de cohorte extérieure pour valider les données obtenues dans un laboratoire. Ainsi, le score IFM et le score

UAMS ont démontré leur fiabilité par des validations externes sur des cohortes indépendantes de patients.

**Nous avons testé le score IFM sur plusieurs cohortes de patients :**

- Sur les cohortes décrites par Shaughnessy (Shaughnessy et al, 2007) : Sur l'ensemble de la cohorte (532 patients) (figure 25) et sur la cohorte d'entraînement (256 patients inclus dans le protocole TT2), le score IFM était prédictif de la survie en analyse univariée mais pas en analyse multivariée ( $p=0,26$ ). En revanche, sur la cohorte de validation (158 patients inclus dans le protocole TT3) le score IFM n'était pas prédictif de la survie (tableau 10). Le score UAMS a été établi à partir des données de patients ayant eu un décès précoce alors que notre score a été établi à partir de tous les patients décédés. De ce fait, le score UAMS est probablement plus prédictif des décès précoces. Dans la cohorte de validation de Shaughnessy, le suivi médian était très court (13 mois). Toutes ces données expliquent probablement l'absence d'impact pronostique du score IFM sur cette cohorte. Une nouvelle analyse sur cette cohorte avec un recul évolutif plus important est nécessaire.



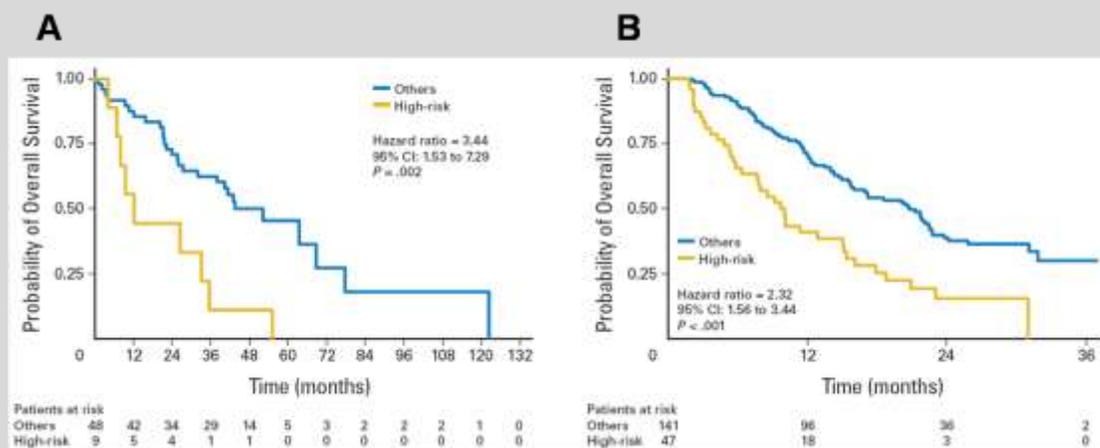
**Figure 25 : Validation du score IFM sur l'ensemble des deux cohortes de Shaughnessy (532 patients).**

Univariate and Multivariate Analyses of IFM and UAMS Risk Models Applied to TT2 and TT3 UAMS Data Sets							
Predictor	Data Set	Univariate Analysis	95% CI	P	Adjusted Cox HR	95% CI	P
IFM model	TT2	2.18	1.40 to 3.40	< .001	1.35	0.83 to 2.21	.26
UAMS model	TT2	5.07	2.95 to 8.71	< .001	4.37	2.64 to 7.24	< .001
IFM model	TT3	1.98	0.70 to 5.56	.197	0.99	0.30 to 3.18	.97
UAMS model	TT3	5.1	1.87 to 14.32	< .001	5.21	1.64 to 16.59	< .001
IFM model	TT2 + TT3	2.14	1.42 to 3.21	< .001	1.24	0.78 to 1.95	.36
UAMS model	TT2 + TT3	5.59	3.67 to 8.51	< .001	4.69	2.95 to 7.46	< .001

Abbreviations: IFM, Intergroupe Francophone du Myélome; UAMS, University of Arkansas School of Medical Sciences; HR, hazard ratio.

**Tableau 10 : Analyse univariée et multivariée de l'impact pronostique du score IFM (IFM model) et du score UAMS (UAMS model) dans la cohorte de Shaughnessy.**

- Sur une cohorte de 57 patients de la Mayo Clinic traités par autogreffe, les deux scores étaient des facteurs pronostiques indépendants de la survie (figure 26A et tableau 11).
- Sur les cohortes de patients en rechute décrites par Mulligan (Mulligan et al, 2007) (188 patients traités par bortezomib et 76 par dexaméthasone) : Le score IFM était un prédicteur indépendant de la survie sur l'ensemble de la cohorte (figure 26B) et sur la cohorte des patients traités par bortezomib (tableau 12A). En revanche, notre score n'était pas prédictif de la survie sur la cohorte des patients traités par dexaméthasone (tableau 12B). Le score UAMS était un prédicteur indépendant de la survie dans les deux bras de traitement (tableau 12A et 12B).



**Figure 26 : Validation externe du score IFM.**

(A) Sur la cohorte de la Mayo Clinic, (C) sur les cohortes de patients en rechute décrites par Mulligan.

Univariate and Multivariate Analyses of IFM and UAMS Risk Models Applied Mayo Clinic Data Set						
Predictor	Univariate Analysis (log-rank test)			Adjusted Cox		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
IFM model	3.34	1.53 to 7.29	0.002	2.63	1.15 to 5.99	.021
UAMS model	3.37	1.55 to 7.33	0.002	2.65	1.17 to 6.01	.019

Abbreviations: IFM, Intergroupe Francophone du Myélome; UAMS, University of Arkansas School of Medical Sciences; HR, hazard ratio.

**Tableau 11 : Analyse univariée et multivariée de l'impact pronostique du score IFM (IFM model) et du score UAMS (UAMS model) dans la cohorte de la Mayo Clinic.**

**A**

Table A16. Univariate and Multivariate Analyses of IFM and UAMS Risk Models: Patients Treated With Bortezomib (n = 189)						
Predictor	Univariate Analysis (log-rank test)			Adjusted Cox		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
IFM model	2.32	1.56 to 3.44	< .001	1.96	1.30 to 2.96	.001
UAMS model	2.95	1.86 to 4.67	< .001	2.39	1.48 to 3.87	< .001

Abbreviations: IFM, Intergroupe Francophone du Myélome; UAMS, University of Arkansas School of Medical Sciences; HR, hazard ratio.

**B**

Univariate and Multivariate Analyses of IFM and UAMS Risk Models: Patients Treated With Dexamethasone (n = 76)						
Predictor	Univariate Analysis (log-rank test)			Adjusted Cox		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
IFM model	1.61	0.79 to 3.28	.189	1.65	0.81 to 3.37	.169
UAMS model	3.38	1.60 to 7.15	.001	3.43	1.62 to 7.28	.001

Abbreviations: IFM, Intergroupe Francophone du Myélome; UAMS, University of Arkansas School of Medical Sciences; HR, hazard ratio.

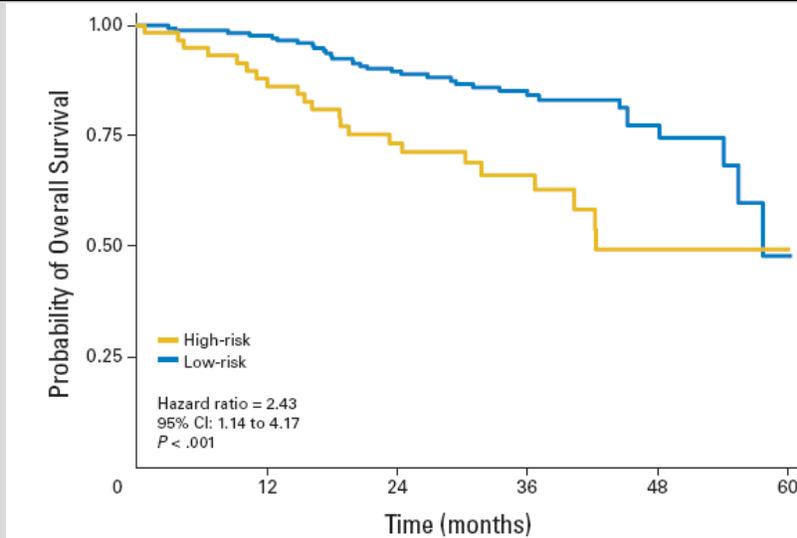
**Tableau 12 : Analyse univariée et multivariée de l'impact pronostique du score IFM (IFM model) et du score UAMS (UAMS model) dans les cohortes décrites par Mulligan.**

(A) Chez les patients traités par bortezomib, (B) chez les patients traités par dexaméthasone.

- Nous avons également testé notre score IFM sur une nouvelle cohorte de 192 patients traités par autogreffe (49 de ces patients étaient communs avec la cohorte ayant servi à établir le score IFM) mais en utilisant des puces commerciales (Affymetrix). Sur cette nouvelle cohorte et avec une technique d'analyse différente, le score IFM restait un facteur prédictif indépendant de la survie (HR 2,08 et p=0,003) (figure 35).

**La validité du score UAMS a également été validé sur des cohortes indépendantes** notamment par Chng (Chng et al, 2008) sur une cohorte de la Mayo Clinic de 71 patients au diagnostic et sur la cohorte APEX de l'étude de Mulligan (Mulligan et al, 2007) (comportant du bortezomib). Dans les deux cohortes, le score UAMS était prédictif de la survie. Par ailleurs, nous avons testé le score UAMS sur notre cohorte de patients. Seuls 10 gènes du score UAMS étaient présents et exprimés sur nos puces. En analyse univariée, le score UAMS était prédictif de

la survie dans notre cohorte (figure 27). Cependant, en analyse multivariée, le score UAMS n'était pas identifié comme un facteur prédictif indépendant ( $p=0,07$ ) (tableau 13).



**Figure 27 : Survie en fonction du score UAMS dans la cohorte IFM.**

Le score UAMS est estimé sur l'expression de 10 gènes.

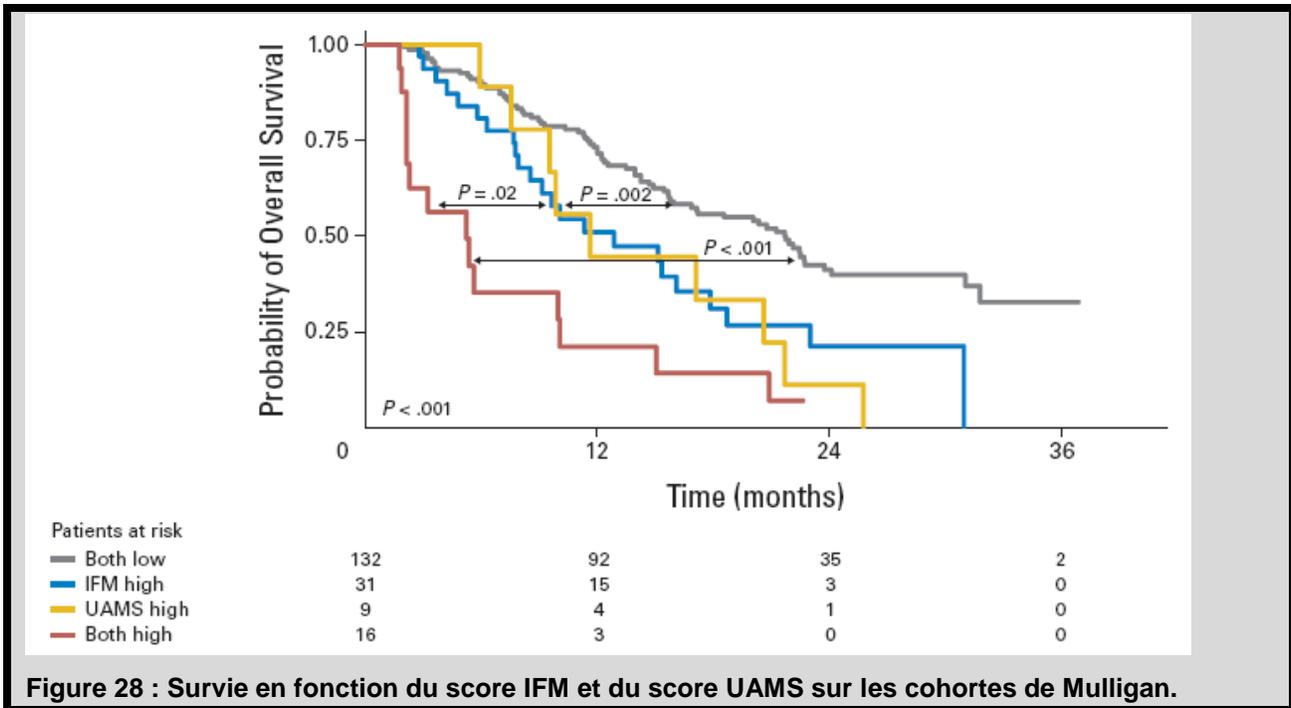
**Table A18.** Univariate and Multivariate Analyses of IFM and UAMS Risk Model Applied to IFM Data Set

Predictor	Univariate Analysis (log-rank test)			Adjusted Cox		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
IFM model	6.77	3.92 to 11.73	< .001	6.13	3.49 to 10.73	< .001
UAMS model	2.43	1.41 to 4.17	.001	1.66	1.95 to 2.88	.075

Abbreviations: IFM, Intergroupe Francophone du Myélome; UAMS, University of Arkansas School of Medical Sciences; HR, hazard ratio.

**Tableau 13 : Analyse univariée et multivariée de l'impact pronostique du score IFM (IFM model) et du score UAMS (UAMS model) dans la cohorte IFM.**

Dans la cohorte de Mulligan, les deux scores sont indépendants et la combinaison des deux scores permet de classer les patients en fonction du nombre de signatures de haut risque (figure 28).



**Figure 28 : Survie en fonction du score IFM et du score UAMS sur les cohortes de Mulligan.**

Les scores IFM et UAMS sont donc de très puissants facteurs prédictifs de la survie dans leur cohorte ( $HR > 5$ ) alors qu'il existe des différences importantes entre les deux études :

- plateformes différentes,
- étude monocentrique (Shaugnessy) ou multicentrique (notre étude),
- stratégies thérapeutiques différentes,...

Les études de Shaugnessy, de Mulligan et la nôtre sont importantes car elles sont les premières à établir un prédicteur de la survie sans se baser sur une classification à priori des patients. Elles sont également les premières à avoir bénéficié d'une validation externe, ce qui renforce la fiabilité des scores proposés.

## V.8 Etude des mécanismes d'action des traitements, identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Quelque soit le traitement utilisé, la réponse est hétérogène. Dès lors, il paraît important d'essayer de comprendre les mécanismes de réponse ou de résistance au traitement. Les puces à ADN sont aussi utiles pour analyser le mécanisme d'action des drogues. On peut, d'une part valider un mécanisme d'action et d'autre part, identifier des cibles secondaires de la drogue en montrant que celle-ci affecte d'autres gènes que celui de la protéine cible théorique.

Deux approches sont possibles:

- **Fondamentale:** l'étude des gènes induits par les traitements permet de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la réponse et la résistance aux traitements. Ceci a permis, dans certains cas, d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques pouvant permettre d'améliorer l'efficacité du traitement ou de vaincre la résistance. L'exemple le plus marquant est celui de Mitsiades qui a mis en évidence une induction des gènes HSP90 (heat shock protein 90) en réponse au bortezomib (Mitsiades et al, 2002). Ces résultats ont conduit à tester les inhibiteurs des HSP90 en association avec le bortezomib. Les premiers résultats in vitro et in vivo ont prouvé l'intérêt de cette association (Mitsiades et al, 2006; McMillin et al, 2007).
- **Clinique:** Les profils d'expression génique peuvent être utilisés pour rechercher des marqueurs moléculaires prédictifs de la réponse au traitement. Cette approche a été menée par Mulligan (Mulligan et al, 2007). L'objectif final serait de pouvoir proposer aux patients un traitement individualisé tenant compte du pronostic et de la sensibilité au traitement.

### V.8.1 Compréhension des mécanismes de réponse et de résistance aux traitements

Parallèlement aux travaux sur les plasmocytes malins, les profils d'expression génique ont très vite été utilisés pour essayer de comprendre les mécanismes de réponse et de résistance aux traitements. Dans un premier temps, des lignées de myélome sensibles ou résistantes à un

traitement donné étaient comparées afin de mieux comprendre les mécanismes de réponse au traitement.

Les deux objectifs essentiels de ces études étaient :

- décrire les mécanismes d'action des drogues
- identifier les mécanismes de résistance aux traitements

En 1998, Der a mené une étude dont l'objectif était d'identifier de nouveaux gènes induits par l'interféron (IFN) (Der et al, 1998). Trois types d'IFN ont été étudiés dans une lignée de fibrosarcome humaine (HT1080). Les cellules étaient mises en contact avec l'un des 3 IFN pendant 6 heures puis l'ARN isolé. Avec des puces commerciales représentant 6 800 gènes, les auteurs ont constaté que le traitement par IFN n'induisait pas seulement des dérégulations de gènes connus comme reliés à l'IFN mais également d'autres gènes. Il était notamment noté une surexpression de gènes liés à l'apoptose (phospholipide scramblase, HIF1 alpha,...) et de deux gènes antiapoptotiques (RAP46/bag2, et bcl2). Par ailleurs, les signatures d'expression induites par les différents types d'IFN n'étaient pas identiques. Les 3 points à retenir de cette étude étaient :

1. Les profils d'expression génique étaient capables d'identifier l'expression de gènes connus comme induits par l'IFN. Cela démontrait la fiabilité et la validité de l'approche technique.
2. Les profils d'expression génique ont permis d'identifier de nouveaux gènes induits par l'IFN et pouvant expliquer en partie son impact thérapeutique.
3. Les gènes ne sont pas induits de manière comparable entre les différents IFN. Ceci peut avoir des conséquences pour l'utilisation des IFN en clinique humaine.

Cette étude était l'une des premières à avoir utilisé les profils d'expression génique pour étudier la réponse après exposition des cellules à un traitement. Elle a permis de valider l'intérêt des profils d'expression génique dans cette indication et a démontré que les études de profils d'expression génique pouvaient permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action des traitements. Ce type d'approche a, par la suite, été utilisé dans le myélome.

### **V.8.1.1 Dexaméthasone :**

Le mécanisme d'action de la dexaméthasone a été étudié par comparaison des profils d'expression obtenus dans deux variants d'une même lignée de myélome multiple, l'une sensible (MM1S) et l'autre résistante à la dexaméthasone (MM1R) (Chauhan et al, 2002). Les analyses sur MM1S après 2, 4 et 24 heures d'exposition à la dexaméthasone (10 $\mu$ M) montraient que 94 gènes étaient induits ou réprimés par l'exposition au traitement. La dérégulation de ces gènes était progressive avec peu de modification avant 4 heures. Cependant, plusieurs gènes liés à l'apoptose étaient dérégulés dès 2 heures avec un pic à 24 heures. Les gènes dérégulés codaient pour des protéines impliquées dans différents mécanismes cellulaires : facteurs de transcription, protéines de surface, molécules d'adhésion, voies de signalisation, ... Parmi ces gènes, on notait l'induction de gènes en lien avec la croissance et la survie cellulaire (tel que le gène MAP kinase phosphatase qui inhibe la croissance induite par MAPK) et la répression d'antiapoptotiques (Bcl-XL). L'exposition à la dexaméthasone induisait également l'expression de Ikappa-Balpa, un des inhibiteurs de NF $\kappa$ B. Les auteurs ont confirmé que la dexaméthasone inhibait l'activation de NF $\kappa$ B induite par le TNF $\alpha$ . Cette inhibition de NF $\kappa$ B peut être responsable de l'apoptose induite par la dexaméthasone. Cependant, parallèlement la dexaméthasone induisait l'expression du récepteur de l'IL6 (IL6R). L'IL6 a un rôle auto et paracrine sur la croissance des cellules de myélome (Anderson et al, 1989; Klein et al, 1989). L'IL6 est capable d'inhiber l'apoptose des cellules de myélome via l'activation de la voie PI3K / AKT (Hideshima et al, 2001).

Cette étude démontrait donc que la dexaméthasone induit un double signal, proapoptotique par inhibition de NF $\kappa$ B et antiapoptotique avec l'induction de IL6R. La connaissance de ces deux mécanismes est intéressante sur le plan thérapeutique en suggérant l'intérêt d'associer à la dexaméthasone des traitements inhibiteur de NF $\kappa$ B (les inhibiteurs du protéasome notamment) ou des inhibiteurs de l'IL6.

Les auteurs ont ensuite comparé les profils d'expression génique des lignées MM1S et MM1R. L'analyse a permis d'identifier 46 gènes discriminants associés à l'acquisition de la résistance. Parmi les gènes discriminants le gène du récepteur aux glucocorticoïdes était fortement sous exprimé dans la lignée MM1R. Inversement des gènes de réponse au stress étaient fortement surexprimés et notamment les gènes codant pour des protéines protectrices de l'apoptose (HSP 28

et HSP 72) et des gènes potentiellement capables de réguler NFκB (Ubch5 (ubiquitin conjugating enzyme 5) et BTK (Bruton's tyrosine kinase)).

### **V.8.2 Bortezomib**

Les inhibiteurs du protéasome sont des inhibiteurs de NFκB mais plusieurs études ont montré que leur effet proapoptotique ne pouvait se résumer à ce seul effet (Zimmermann et al, 2000; Hideshima et al, 2001; Fleming et al, 2002).

Une première étude a étudié l'impact de deux inhibiteurs du protéasome (bortezomib et PS-519) sur la levure *saccharomyces cerevisiae* en combinant les profils d'expression génique et l'inhibition de croissance compétitive (Fleming et al, 2002). Cette étude a montré que l'exposition aux inhibiteurs du protéasome induisait la dérégulation coordonnée d'un groupe de gènes et non une dérégulation anarchique. Ce résultat a conduit Mitsiades à étudier l'impact du bortezomib sur une lignée de myélome humaine (Mitsiades et al, 2002). Il a étudié les modifications de profils d'expression génique induite sur la lignée MM1S (sensible au PS341) après exposition à de fortes doses de bortezomib 100 nM pendant 1, 2, 4 ou 8 heures. Le bortezomib ne supprimait pas l'activité transcriptionnelle des cellules mais induisait des changements coordonnés d'expression génique.

Les modifications ciblées de transcription impliquaient :

- Une diminution d'expression de gènes codant pour des facteurs de croissance (IGF1 et IGF1 R) ou des molécules anti apoptotiques (Bcl2, FLIP XIAP)
  - Une induction de membre de la cascade apoptotique (Caspase 4 9 procaspase 1 5 7 8 fas et fas ligand)
  - Une surexpression de gènes voies ubiquitine protéasome
  - Une surexpression importante des gènes codant pour les heat shock protein (HSP 90, HSP 70, HSP 40,...) correspondant à une réponse au stress pouvant protéger les cellules contre l'apoptose.
- Cet effet était l'un des plus intenses induit par le bortezomib et a conduit les auteurs à tester l'effet de l'inhibition des HSP sur la sensibilité des cellules au bortezomib. Ils ont ainsi démontré que des inhibiteurs de HSP 90 sensibilisaient la lignée MM1S à l'action du bortezomib.

En dehors de l'amélioration des connaissances concernant les effets du bortezomib sur les cellules, cette étude a eu un impact thérapeutique en conduisant au développement de nouveaux traitements. Au vue de leurs résultats, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'association d'inhibiteur des HSP 90 pouvait avoir un effet sensibilisant des cellules aux traitements cytotoxiques comme le bortezomib. Cette hypothèse a, depuis, été validée avec succès in vitro (Mitsiades et al, 2006) et des essais de phase II sont en cours chez l'homme avec le 17AAG (McMillin et al, 2007).

Quelques autres études ont été menées sur le bortezomib mais, à ce jour, sans impact sur la prise en charge thérapeutique des patients. Ainsi, Landowski (Landowski et al, 2005) a étudié l'effet de l'exposition de la lignée RPMI 8226 au bortezomib 50nM pendant 4 heures et a démontré que la dérégulation de l'homéostasie du calcium par les mitochondries était un mécanisme important de la toxicité du bortezomib.

Ces différentes études ont démontré que l'analyse des profils d'expression génique de lignées cellulaires après exposition à un traitement pouvait permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action des traitements, les mécanismes de défense cellulaire et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

### **V.8.3 ARTICLE 3 : Identification d'un gène (REDD1) potentiellement impliqué dans la résistance au bortezomib**

Les résultats de l'essai IFM 05-01 ont montré que l'association bortezomib-dexaméthasone en traitement d'induction augmentait le taux de réponse avant et après autogreffe et s'accompagnait d'une meilleure survie sans progression (Harousseau et al, 2008). Cette association va probablement devenir le traitement d'induction de référence des patients de moins de 65 ans atteints de myélome. Pour autant, certains patients ne répondent pas au bortezomib. Il paraît important d'essayer d'identifier les patients répondeurs pour adapter le traitement. Compte tenu des délais nécessaires pour obtenir des données évolutives concernant les patients, nous avons débuté une étude préliminaire sur les lignées de myélome.

Les résultats publiés par les autres équipes travaillant sur le myélome montrent qu'un nombre restreint et ciblé de gènes sont dérégulés par le bortezomib (Mitsiades et al, 2002; Landowski et al, 2005). Cependant, dans ces études, les doses utilisées étaient trop fortes pour rendre compte de l'effet de cette drogue chez les patients, et une seule lignée était étudiée. Par rapport aux travaux déjà publiés, nous avons pris le parti d'étudier plusieurs lignées de sensibilité différente et de les exposer aux mêmes doses de bortezomib-dexaméthasone afin de pouvoir observer les mécanismes mis en jeu à la fois dans les cellules sensibles et les cellules résistantes. Les doses choisies étaient adaptées à celles accessibles en clinique et n'étaient pas toxiques pour toutes les lignées étudiées.

Le but de ce travail était d'utiliser les techniques d'étude du profil d'expression génique pour (1) identifier les gènes dont l'expression est corrélée à l'action de l'association bortezomib-dexaméthasone dans les cellules de myélome, (2) mettre en évidence de nouvelles voies d'action de l'association bortezomib-dexaméthasone dans le myélome, (3) réaliser des études fonctionnelles sur les gènes clés de ces voies. L'objectif ultime étant de définir de nouveaux acteurs impliqués dans les mécanismes mis en jeu par les cellules de myélome pour résister à l'action de l'association bortezomib-dexaméthasone et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques dont l'inhibition pourrait renforcer l'action de ce traitement.

### V.8.3.1 Résultats

Nous avons démontré que l'inhibition de la voie mTOR via l'activation du gène REDD1 (Regulated In Development and DNA Damage Responses 1) est un mécanisme potentiel de résistance à l'association bortezomib-dexaméthasone.

(1) 9 lignées de myélome de sensibilité variée au bortezomib ont été exposées pendant 6 heures à une combinaison bortezomib (10nM) et dexaméthasone 1  $\mu$ M puis les profils d'expression génique analysés. Dans toutes les lignées de fortes dérégulations ciblées de gènes ont été observées. Il existait une grande hétérogénéité entre les lignées. Cependant, l'analyse comparative des lignées traitées et non traitées par SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher et al, 2001) a identifié 25 gènes significativement dérégulés entre les lignées traitées et non traitées (q value = 0 et fold change > 2 or < 0.5) (figure 29).

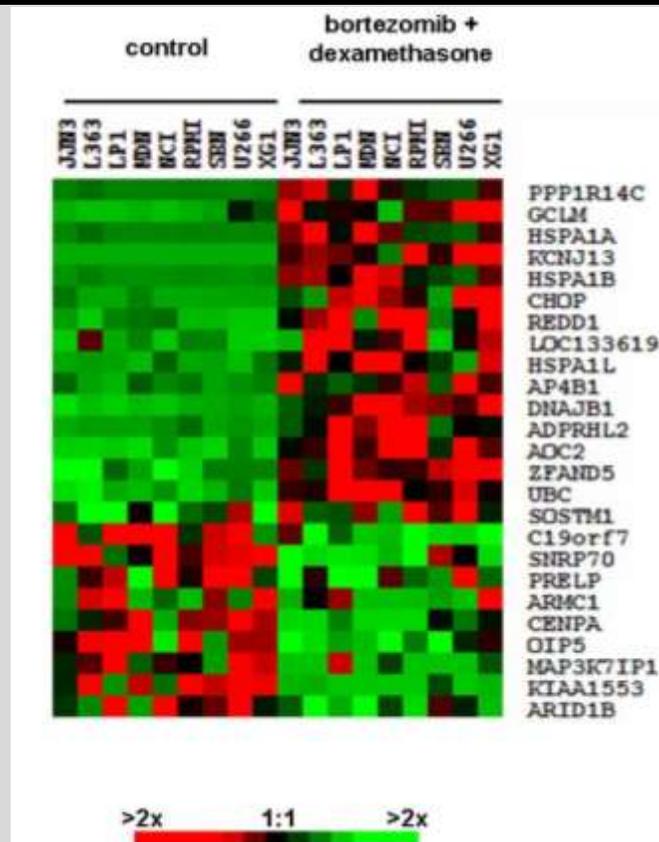


Figure 29 : Représentation des niveaux d'expression des 25 gènes significativement dérégulés après exposition à la combinaison bortezomib-dexaméthasone.

Parmi les 16 gènes sur exprimés après traitement, nous avons observé 7 gènes de réponse à différents stress : (HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, DNAJB1, SQSTM1, CHOP and REDD1). Le gène REDD1 nous a paru particulièrement intéressant. C'est un gène de description récente décrit comme induit par de nombreux stress (arsenic, hypoxie, dexaméthasone, thapsigargin, tunicamycine, heat shock,...) (Wang et al, 2003; Brugarolas et al, 2004; Lin et al, 2005; Schwarzer et al, 2005; Sofer et al, 2005) et lésions de l'ADN (radiation ionisante, ultra violet, alkylants DNA) (Ellisen et al, 2002; Lin et al, 2005). Les études publiées sur REDD1 suggéraient un rôle pro ou anti apoptotique dépendant du contexte cellulaire (Shoshani et al, 2002; Gery et al, 2007).

(2) nous avons ensuite focalisé notre attention sur le gène REDD1. L'expression du gène (RT-PCR) et de la protéine (Western blot) survenait précocement après 2h et 4h d'exposition. Cette induction était indépendante de la dexaméthasone.

(3) nous avons comparé l'expression de REDD1 avec la viabilité cellulaire après exposition au bortezomib-dexaméthasone sur 3 lignées de myélome (U266, LP1 et MDN). Nous avons observé que l'induction de REDD1 était importante (supérieure à 15 fois) dans les lignées peu sensibles à bortezomib-dexaméthasone (viabilité à 24h 100% pour LP1 et 68% pour U266) et très faible (induction 5 fois) dans la lignée sensible au bortezomib-dexaméthasone (viabilité à 24h 10% pour MDN). Nous avons constaté que la taille des cellules diminuait précocement parallèlement à l'induction de l'expression de REDD1.

La suite de nos résultats a été obtenue sur une seule lignée (U266), car de sensibilité intermédiaire au bortezomib-dexaméthasone et accessible facilement à la transfection de siRNA.

(4) REDD1 ayant été décrit dans plusieurs modèles comme capable d'inhiber la voie mTOR (Brugarolas et al, 2004; Wang et al, 2006; DeYoung et al, 2008), nous avons ensuite étudié les effets de l'induction de REDD1 sur l'activité de cette voie métabolique. L'induction de REDD1 s'accompagnait d'une déphosphorylation de la protéine P70 S6K un des substrats directs essentiels de la voie mTOR (Fingar et al, 2002) suggérant que l'induction de REDD1 inhibe la voie mTOR

(5) une inhibition transitoire de l'expression de REDD1 par siRNA s'accompagnait d'une inhibition de la déphosphorylation de P70S6K, d'une abolition de la diminution de taille et de la restauration partielle de la sensibilité au bortezomib-dexaméthasone.

(6) la dexaméthasone n'entraînait ni induction de REDD1 ni inhibition de mTOR dans les lignées et aux doses utilisées.

Tous ces résultats suggéraient que l'inhibition de mTOR via l'induction de REDD1 était un potentiel mécanisme de résistance des cellules de myélomes au bortezomib-dexaméthasone.

### **V.8.3.2 Commentaires**

REDD1 est un gène de description récente qui a été décrit comme gène de réponse à de multiples stress (Ellisen et al, 2002; Wang et al, 2003; Brugarolas et al, 2004). Son interaction avec la voie mTOR a été observée dans de nombreux modèles, en réponse à des stress variés (stress hypoxie, dexaméthasone, privation énergétique,...) (Sofer et al, 2005; Wang et al, 2006; DeYoung et al, 2008). Il a également été montré que REDD1 régule la taille des cellules via son action sur mTOR (Ellisen 2005; Sofer et al, 2005). Cependant, c'est la première fois que l'induction de ce gène est démontrée dans le myélome. Nos résultats suggèrent que REDD1 est impliqué, au moins en partie, dans la sensibilité au bortezomib.

Nos résultats sont contradictoires avec plusieurs études montrant un effet antiapoptotique de mTOR et suggérant que mTOR pourrait être la cible de traitement anti cancéreux (Guertin et al, 2005; Abraham et al, 2007; Chiang et al, 2007). Les inhibiteurs de mTOR ont été testés dans plusieurs modèles de cancer. Ils inhibent la croissance et la prolifération de plusieurs lignées de cellules cancéreuses. La possibilité d'utilisation en clinique a été validée par un essai publié récemment dans le cancer du rein où leur prescription était associée à un bénéfice de survie (Raymond et al, 2004). Cependant, toutes les tumeurs ne répondent pas aux inhibiteurs de mTOR et leur effet semble dépendant de l'activation de la Voie PI3K/AKT et du statut PTEN. Une grande sensibilité a été observée dans les lignées de cancer du cerveau, du sein, de la prostate et de myélome déficientes en PTEN. Dans le myélome, les inhibiteurs de mTOR ont un effet

synergique avec la dexaméthasone (Shi et al, 2002; Yan et al, 2006) et le lenalidomide (Raje et al, 2004).

Ces données sont en contradiction avec nos résultats. Cependant, quelques travaux ont montré que l'inhibition de mTOR pouvait avoir un rôle protecteur de la survie des cellules. Ainsi, dans les cellules humaines JURKATT, l'inhibition permanente de mTOR s'accompagnait d'une diminution de la prolifération puis de la taille cellulaire (Fumarola et al, 2005). Parallèlement, ces cellules étaient résistantes à l'apoptose. La réactivation du mTOR s'accompagnait d'une réversion du phénotype et de la restauration d'une sensibilité normale à l'apoptose. De plus, Shi a démontré que l'inhibition de mTOR par des faibles doses de rapamycine (0,1 -10nM) induisait une activation de AKT et une protection des cellules de myélomes vis-à-vis de l'apoptose induite par le bortezomib (Shi et al, 2005). La comparaison de l'effet d'un inhibiteur de mTOR (rapamycine) et de REDD1 est difficile. Cependant, la diminution de taille et la déphosphorylation de P70S6K observée après induction de REDD1 était comparable à celle induite par la rapamycine (20 nM).

Nos résultats sont donc soutenus par des données de la littérature et suggèrent que l'utilisation de combinaison associant inhibiteur de mTOR et bortezomib doit être étudiée avec attention car elle pourrait être délétère.

# **COPIE DE L'ARTICLE 3**

Soumis à Cancer Science

**Article title:**

**Inhibition of mTORC1 activity via REDD1 induction in myeloma cells resistant to bortezomib cytotoxicity**

**Authors:**

Olivier Decaux<sup>a,b</sup>, Monique Clément<sup>a</sup>, Florence Magrangeas<sup>a,c</sup>, Wilfried Gouraud<sup>a,d</sup>, Catherine Charbonnel<sup>a,d</sup>, Loïc Campion<sup>a,d</sup>, Hervé Avet Loiseau<sup>a,c</sup>, and Stéphane Minvielle<sup>a,c</sup>.

**Author affiliations :**

<sup>a</sup> INSERM, U892, Université de Nantes, France.

<sup>b</sup> Service de Médecine Interne, Hôpital Sud, CHU de Rennes, France.

<sup>c</sup> Laboratoire d'Hématologie, CHU de Nantes, France.

<sup>d</sup> Centre de Lutte contre le Cancer Nantes Atlantique, Nantes-Saint Herblain, France

**Corresponding author:**

Stéphane Minvielle,

Inserm U892

Institute of Biology,

9 Quai Moncousu Nantes, 44093 France

Phone number: (33) 2 40 16 56 91

Fax: (33) 2 40 35 66 97

E-mail: [stephane.minvielle@chu-nantes.fr](mailto:stephane.minvielle@chu-nantes.fr)

**Key words:**

Multiple myeloma, bortezomib, mammalian target of rapamycin, REDD1, resistance.

## **ABSTRACT**

The combination of bortezomib and dexamethasone is becoming the reference induction treatment for multiple myeloma patients younger than 65 years. Despite its advantage over vincristin adriamycin dexamethasone (VAD) induction treatment, bortezomib does not benefit to all patients. We hypothesize that heterogeneity of the response experienced by myeloma patients is at least in part due to genomic variations in the malignant plasma cells. To test this hypothesis we used gene expression profiling to identify early responsive genes induced by bortezomib in resistant myeloma cells. Our study revealed (1) a dramatic induction of REDD1, a negative regulator of mammalian target of rapamycin kinase complex 1 (mTORC1) activity, in these cells, (2) a transient cell size decrease associated with REDD1 overexpression and (3) partial restoration of bortezomib sensitivity in REDD1 knockdown bortezomib-resistant myeloma cells. Together, these results identify a possible novel mechanism of bortezomib resistance in myeloma patients mediated by REDD1 overexpression involving inhibition of mTORC1 activity and suggest that the use of mammalian target of rapamycin inhibitors in myeloma patients could be deleterious.

## **Introduction**

Multiple myeloma (MM) is a plasma-cell neoplasm, characterized by skeletal destruction, renal failure, anemia and hypercalcemia. Despite progress in the management of patients, MM remains an incurable disease, with a five-year survival rate not exceeding 50 percent. In 2005, a member of a new class of drug called proteasome inhibitors, Velcade® (bortezomib – PS-341) has proven its superiority to high-dose dexamethasone for the treatment of relapsed MM[1]. Combination with dexamethasone was secondly proved to enhance bortezomib efficacy[2]. Clinical studies are currently evaluating the combination bortezomib - dexamethasone in first line treatment of MM. Since preliminary results showed improvement of response[3], bortezomib - dexamethasone is becoming the reference induction treatment for patients younger than 65 years. However, there are some patients who do not respond to bortezomib or who respond briefly and then relapse. Understanding mechanisms of resistance to bortezomib could help to identify new targets of treatment.

MM cells are mainly localized in the bone marrow. The interactions of MM cells with the bone marrow microenvironment activate various proliferative/antiapoptotic signaling pathways including JAK/STAT, ras/MAPK, PI3-K/Akt and downstream mammalian target of rapamycin kinase complex 1 (mTORC1)[4-6]. mTORC1 is a complex of proteins that includes the mammalian target of rapamycin (mTOR) and several regulatory proteins[7, 8]. These survival signaling pathways have complex interactions. One downstream target of mTORC1 is the insulin receptor substrate-1 (IRS-1), a key adapter transmitting signals from activated insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors[9]. An mTORC1-dependent serine phosphorylation of IRS-1 results in its dissociation from IGF-1 receptors, with subsequent downregulation of insulin or IGF-1 signaling. A recent study by Mitsiades et al. suggests that IGF-1 is a key mediator of serum for stimulation of proliferation and survival of multiple myeloma cells in vitro or in vivo[10]. Moreover, IGF-1 was proven to decrease the sensitivity

of myeloma cells to bortezomib[11]. Thus, by enhancing IGF-1-induced activation, inhibition of mTORC1 activity could have an antiapoptotic effect.

In this study, we performed gene expression profiling to analyze the complex signaling pathways regulating the early response to bortezomib – dexamethasone in myeloma cells. We identified several stress response genes, including *REDD1*, significantly induced after bortezomib – dexamethasone exposure. We showed that REDD1 overexpression is more potent in bortezomib-resistant myeloma cells and is associated with a cell shrinkage and repression of mTORC1 pathway. Our data revealed a possible resistant mechanism to bortezomib cytotoxicity in MM.

## **Materials and methods**

### **Human myeloma cell lines (HMCL) and culture conditions**

The IL-6 dependent HMCLs: XG1, MDN, SBN which have been previously established in our laboratory, were cultured in the presence of 3 ng/mL of recombinant human IL-6 (Novartis, Basel, Switzerland)[12]. U266, LP1, L363, JN3, RPMI-8226 and NCI-H929 HMCLs were commercially acquired. HMCLs were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 5% FCS, 2 mM glutamine and 10  $\mu$ M 2- $\beta$ -mercapto-ethanol.

### **Antibodies and reagents**

Bortezomib (OrthoBiotec, Bridgewater, NJ) was used at 10 nM. Dexamethasone (Sigma-Aldrich, ST Quentin Fallavier, France) was used at 1 $\mu$ M. Rapamycin (Merck Biosciences, Darmstadt, Germany) was used at 20 nM. The used concentrations of bortezomib and dexamethasone are considered within the range of therapeutically doses.

Anti-REDD1 was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). Anti-p70 S6 kinase, anti-phospho-p70 S6 kinase (Thr 389), were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-actin monoclonal antibody was from

Chemicon International (Temecula, CA).

#### **Total RNA isolation**

HMCLs were treated with 10 nM bortezomib and 1  $\mu$ M dexamethasone for 6 hours and harvested for RNA isolation. Three independent experiments were done for each HMCL. Five million plasma cells were used to prepare total RNA using the guanidinium thiocyanate–phenol method[13]. Integrity of RNA preparations were assessed with 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Palo Alto, CA) using Agilent 2100 Expert software.

#### **cDNA microarray technology**

One channel DNA microarrays were constructed from 17,134 EST cDNA clones representing 11,250 unique genes. End-sequence-verified I.M.A.G.E. clones were purchased from RZPD German Resource Center for Genome Research (Berlin, Germany) or provided by the Human Genome Mapping Project Resource Centre (Hinxton, UK) and sequenced by MilleGen (Labege, France). cDNA microarray technology procedures have been extensively described[14, 15].

Probe synthesis and hybridization were conducted as follows: 2 $\mu$ g RNA was primed with random hexaprimers and reverse transcribed with a mix of cold dNTPs and [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP.

DNA microarrays were scanned at 25 $\mu$ m resolution using a Fuji BAS 5000 image plate system (Fuji, Ltd, Tokyo, Japan). Hybridization signals were quantified using ArrayGauge software v.1.3 (Fuji, Ltd). For each membrane, data were normalized by the global hybridization intensity. A background value was calculated from negative controls median  $\pm$  6 SD and subtracted to each value. After expression data correction for the amount of PCR product spotted onto the membrane, 8 897 features detected in at least 5% of the patients were retained for subsequent analysis.

Genes that were overexpressed or underexpressed in treated vs non treated HMCLs were selected using significance analysis of microarray (SAM)[16] applied to the retained 8 897 probe sets. Genes differentially modulated with a null q value and with a fold change superior to 2 or inferior to 0.5 were considered significant.

#### **Data availability**

The microarray data analyzed in this study have been deposited in the NIH Gene Expression Omnibus data base at [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) under the following accession number GSE11866.

#### **Apoptosis experiments**

Bortezomib - dexamethasone induced cell death was evaluated on a FACSCalibur using the CellQuest program (Becton Dickinson, San Jose, CA) by both APO 2.7 staining (Beckman Coulter, Marseille, France) and combined analysis of altered cellular morphology (lower FSC and higher SSC).

#### **Cells size measurement**

Cell size was measured using the Gold software (Clara Vision, Orsay, France) image analysis system coupled to a CCD video camera and a Nikon TMS inverted light microscope equipped with a 20X objective. This method of cell size measurement was chosen as it was proved to be more precise than flow cytometry analysis[17].

#### **Quantitative Real-Time RT-PCR (QRT-PCR)**

After RNA extraction and DNase treatment (turbo DNase – Ambion, Inc., Austin, Texas), 1µg of the total RNA was reverse transcribed using Maloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) and random hexamers (Amersham, Bioscience, UK). QRT-PCR was performed in 96-well plates with the use of pre-designed gene-specific TaqMan® probes and primer sets from Applied Biosystems (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France): Hs00430304\_g1 for *REDD1*, and Hs99999903\_m1 for

*Actin*. The transcripts were amplified with TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagent (Applied Biosystems) and a sequence detection system Stratagene Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA) according to manufacturer's instructions. Each run included a buffer blank and no-template control to test for contamination of assay reagents. Gene expression was quantified in relation to the expression of *Actin* with the use of sequence detector software and the relative quantification method.

#### **Immunoblot analysis**

Plasma cells ( $5 \times 10^6$ ) were suspended in lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 2mM PMSF, 1% Triton X100 and 2 mg/mL aprotinin). After 40 min on ice, lysates were cleared by centrifugation at 12 000 g for 30 min at 4°C. Protein concentration was measured using bicinchoninic acid (BCA protein assay, Pierce, Rockford, IL). One hundred micrograms of proteins were loaded for each lane. The proteins were separated by 10% or 12.5% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Western blot analysis was performed by standard techniques, with ECL detection (Pierce) for REDD1, p70 S6K and actin, or with SuperSignal detection (West Dura Extended Duration Substrate, Pierce) for phospho-p70 S6K. Amount of protein loading was checked with anti-Actin monoclonal antibody.

#### **REDD1 RNA interference assay**

siRNA targeting REDD1 and siRNA control were synthesized by Ambion (Warrington, UK). U266 cells were electroporated using a Nucleofector system (Amaxa /Lonza Group Ltd Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Briefly,  $5 \cdot 10^6$  U266 cells were resuspended in 100µL R nucleofector solution (Amaxa). Cells were mixed with 10 µM of siRNA in the Amaxa cuvette and directly placed in the nucleofector device. Cells were treated with program T-01. Cell suspension was removed immediately from the cuvette by

adding prewarmed medium with the Amaxa pipette. Cell suspension was added to a 6-well plate containing prewarmed medium and was cultured at  $1.10^6$  cells/mL for 2 hours before incubation with bortezomib-dexamethasone.

#### **Hoechst 33342 staining**

U266 cells were fixed in 2% formaldehyde in culture medium for 20 min. Cells were then washed in PBS and stained with Hoechst 33342 (Molecular Probes, Cergy Pontoise, France) at 4  $\mu\text{g/mL}$  and phalloidin 2  $\mu\text{g/ml}$  (Sigma) for 5 min at room temperature and washed in PBS. Microcopy analysis was performed on a fluorescence microscope (Leica GMBH, Germany).

#### **Statistical Analysis**

We used the Student's t-test for comparing cell sizes of treated cells.

## **Results**

### **Bortezomib-dexamethasone treatment induces rapid expression of stress related genes**

We performed gene expression profiling in 9 HMCLs incubated or not with bortezomib 10 nM – dexamethasone 1 $\mu\text{M}$  for 6 hours. These concentrations were used in the study because they are considered to be within the range of therapeutically achievable doses. No HMCL exhibited morphological features of apoptosis until 12 hours of treatment with bortezomib - dexamethasone. Using untreated cells as baseline, SAM analysis was used to select genes significantly deregulated after bortezomib - dexamethasone exposure. The analysis revealed 25 genes that are significantly overexpressed or underexpressed (q value = 0 and fold change > 2 or < 0.5) in the 9 treated HMCLs (Table 1). Among the 16 top induced genes, 7 genes are known to be involved in various stress response (*HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPAIL*, *DNAJB1*, *SQSTM1*, *CHOP* and *REDD1*). Of particular interest is *REDD1* also

known as *RTP801/dig2/DDIT4*. It is a novel stress response gene reported to be induced by various cellular stresses (arsenic, hypoxia, dexamethasone, thapsigargin, tunicamycin and heat shock)[18-22] and DNA damage (ionizing radiation, ultraviolet radiation, DNA alkylant)[23, 24]. Studies on REDD1 regulation suggest a protective or accelerating role in apoptosis depending on the cell type[18, 20, 25, 26]. Therefore, REDD1 appeared to be a good candidate for participating in MM cell resistance to bortezomib – dexamethasone.

#### **REDD1 expression is rapidly induced by bortezomib-dexamethasone exposure**

To go further on the kinetic of REDD1 induction, we performed QRT-PCR and western blot analysis using U266 at 2, 4 and 6 hours after bortezomib – dexamethasone exposure. Our results showed that *REDD1* transcripts are rapidly and strongly induced within 2 hours and reach a plateau at 4 hours (Fig. 1A) while REDD1 synthesis is patent at 4 hours and still increasing at 6 hours (Fig. 1B).

#### **REDD1 induction is correlated with viability and cell size in myeloma cell lines**

Depending on the cellular context, REDD1 was shown to function as either a pro- or anti-survival factor[18, 20, 25, 26]. To establish the consequences of *REDD1* overexpression on plasma cells response to bortezomib – dexamethasone we firstly compared REDD1 induction in three myeloma cell lines that are differentially sensitive to bortezomib – dexamethasone exposure. We evaluated *REDD1* mRNA levels in LP1, U266 and MDN HCMLs (Fig. 2A). QRT-PCR analysis revealed that strong *REDD1* induction (more than 15 fold) was found in the bortezomib – dexamethasone resistant or mildly sensitive cells LP1 and U266 (respectively 100% and 65% of viability at 24 hours (Fig. 2B)) while moderate REDD1 induction (less than 5 fold) was detected in MDN sensitive cells (~10% of viable cells at 24 hours (Fig. 2B)). Secondly because REDD1 has been described to be an essential regulator of

cell growth in response to energy stress[19], we evaluated the association between *REDD1* induction and cell size evolution in response to bortezomib – dexamethasone in these three myeloma cell lines. Cell size measurement clearly showed a rapid (as soon as 2 hours) significant cell size decrease in myeloma cells that strongly induced *REDD1* in response to bortezomib – dexamethasone while no morphological changes were observed in myeloma cells that did not overexpressed *REDD1* (Fig. 2C). These morphological changes persisted after 6 hours exposure to treatment and were not associated with nuclear fragmentation or APO 2.7 staining (data not shown).

#### **REDD1 overexpression is associated with inhibition of mTORC1 activity**

In several cell types, *REDD1* has been described as a negative regulator of mTORC1 activity in response to various stresses[22, 27, 28]. Moreover *REDD1* effect on cell growth was described to be mediated by mTORC1 signaling[19]. Therefore we investigated the effect of bortezomib – dexamethasone on mTORC1 activity. We performed protein immunoblots to analyze the phosphorylation state of p70 S6 ribosomal kinase (p70 S6K), one of the best characterized direct substrate of mTORC1[27, 29] and a surrogate marker of mTORC1 activity. Western blot analysis (Fig. 3) revealed a dramatic reduction of phosphorylated p70 S6K in U266 cells incubated with bortezomib – dexamethasone compared to untreated cells while p70 S6K levels remained stable. Given that these cells overexpressed *REDD1* in response to bortezomib – dexamethasone exposure, our results strongly suggest that *REDD1* overexpression inhibits mTORC1 activity in bortezomib-resistant U266 cells.

#### **Dexamethasone alone has no effect on REDD1 expression or on mTORC1 activity**

Given that *REDD1* induction and mTORC1 activity inhibition have been described following dexamethasone exposure[28, 30], we explored the effect of dexamethasone on

REDD1 expression and mTORC1 activity in U266 cells. Bortezomib alone or combined with dexamethasone similarly induced REDD1 induction and dephosphorylation of p70 S6K while dexamethasone (1  $\mu$ M) alone had no effect on REDD1 induction and phospho-p70 S6K levels in these cells (Fig.3).

#### **SiRNA-mediated silencing of REDD1 induction inhibits cell size decrease and enhances sensitivity to bortezomib exposure**

To determine whether prevention of REDD1 induction would lead to restoration of bortezomib sensitivity, we explored the consequences of siRNA based silencing of REDD1 expression in U266. Our results showed that transient transfection of siRNA targeting REDD1 (siREDD1) prior to treatment, impaired REDD1 induction, significantly inhibited dephosphorylation of p70 S6K (Fig. 4A), abolished cell size reduction (Fig. 4B) and partially restored sensitivity to bortezomib (Fig. 4C).

Thus our data suggest a direct involvement of REDD1 overexpression in inducing mTORC1 substrate dephosphorylation and cell size regulation in bortezomib-resistant myeloma cells.

#### **Discussion**

This study provides several lines of evidence that inhibition of mTORC1 pathway via REDD1 induction is a possible mechanism of bortezomib resistance in myeloma. (1) REDD1 expression is early and highly induced after bortezomib exposure in resistant myeloma cell lines, (2) REDD1 overexpression is correlated with dephosphorylation of p70 S6K a key substrate of mTORC1 and with early cell shrinkage, (3) transient transfection of siREDD1 significantly inhibited dephosphorylation of p70 S6K, abolished cell size reduction and partially restored sensitivity to bortezomib.

REDD1 was described by two different studies in 2002 as a transcriptional target of p53 following DNA damage[23] and as a Hypoxia-Inducible Factor 1 - Responsive Gene[26]. REDD1 was later reported to be induced by various cellular stresses (arsenic, hypoxia, dexamethasone, thapsigargin, tunicamycin and heat shock)[18-22] and DNA damage (ionizing radiation, ultraviolet radiation, DNA alkylant)[23, 24] and therefore seems to be an important stress response gene. REDD1 can act as a pro or antiapoptotic factor depending on the cellular context [18, 20, 25, 26]. It was described as pro-survival, protecting cells from apoptosis induced by dexamethasone or hypoxia[18]. REDD1 was demonstrated to have an antiapoptotic role in human prostate carcinoma PC-3 cancer cells and in human keratinocytes HaCaT[20]. The prior expression of REDD1 protected human epithelial breast carcinoma MCF7 and rat pheochromocytoma PC12 cells from hypoxia in glucose-free medium and from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-triggered apoptosis[26]. Inversely, under other conditions, overexpression of REDD1 turned out to be detrimental. Inducible overexpression of REDD1 promotes the apoptotic death of differentiated neuron-like PC12 cells and increases their sensitivity to ischemic injury and oxidative stress[26]. Liposomal delivery of REDD1 cDNA to mouse lungs resulted in massive cell death[26].

Several studies have demonstrated that REDD1 is a critical regulator of mTORC1 pathway under various stress condition such as hypoxia[22, 27], treatment with dexamethasone [28], or energy depletion [19]. Overexpression of REDD1 was sufficient to downregulate phosphorylation of p70 S6K and 4E-BP1, the downstream targets of mTORC1. Changes in REDD1 protein are inversely proportional to changes in mTORC1 activity and protein synthesis under different experimental conditions. REDD1 controls cell growth in response to energy stress through rapid dephosphorylation of p70 S6K and 4E-BP1[19]. The artificial overexpression of REDD1 within cells induces mTORC1 inhibition and a cell size

decrease to a degree quantitatively similar to that induced by treatment with rapamycin[19]. Conversely, knockdown or disruption of REDD1 prevents the suppression of mTORC1 activity observed in response to various stresses and increases cell size[31]. Data in *Drosophila* are consistent with these findings[32].

In our study, early REDD1 induction and mTORC1 deregulation appeared to be independent of dexamethasone exposure. However, inhibitory effects of dexamethasone on p70 S6K phosphorylation have been previously demonstrated in myoblasts and also in myeloma cells[28, 30]. The ability of glucocorticoids to regulate mTORC1 activity depends upon cell context and this effect was not observed in all models. Inhibition of mTORC1 pathway by dexamethasone has been described in one HCML (OCI-MY5)[30]. But in this study, dexamethasone was used at a higher dose (10 $\mu$ M), 10-fold superior to the one we used. Moreover, dephosphorylation of p70 S6K was significant only after 24 hours and not at 6 hours. In our study, a late p70 S6K dephosphorylation (mediated or not by REDD1) by dexamethasone could be masked by early effect of bortezomib.

mTORC1 integrates upstream signals from growth factor receptors via the PI3-K/AKT pathway and from the cellular energy-sensing apparatus via the AMP-activated kinase pathway. mTORC1 controls many aspects of cellular physiology, including transcription, translation, cell size, cytoskeletal organization and autophagy[33, 34]. mTORC1 is involved in response to various stresses (hypoxia, low energy, DNA damage and reducing conditions) by down regulating energy demanding processes and arresting growth. mTORC1 is an important signaling pathway playing a critical role in cell growth [35, 36] as exemplified by a decrease in cell size on rapamycin treatment [19, 29].

Inhibition of mTORC1 activity could have a protective effect on cell survival. In Human T-lymphoblastoid Jurkat cells, reduced cell growth rate induced by persistent deactivation of the mTORC1/p70 S6K-signaling pathway generates a cell population of progressively decreased cellular mass and size[37]. These morphological changes were associated with protection from cell death receptor and mitochondrial mediated apoptosis. This protection declined when reactivation of the pathway promotes cell recovery to normal size. Moreover, one downstream target of mTORC1 is the insulin receptor substrate-1 (IRS-1), a key adapter transmitting signals from activated IGF-1 receptors[9]. An mTORC1-dependent serine phosphorylation of IRS-1 results in its dissociation from IGF-1 receptors, with subsequent downregulation of insulin or IGF-1 signaling. IGF-1 is a critical mediator of serum for stimulation of proliferation and survival of multiple myeloma cells[10] and AKT is a key mediator of its anti apoptotic effect[38]. Moreover, IGF-1 and AKT were proved to decrease bortezomib induced toxicity on myeloma cells[11]. Shi et al showed that low doses of rapamycin (0.1 – 10 nM) provoke a rapid AKT activation as soon as 2 hours after exposure and a significant decrease of bortezomib-induced apoptosis on myeloma cells[39]. It is difficult to compare effects of REDD1 overexpression with effects of rapamycin on mTORC1 activity. However, we observed that the p70 S6K dephosphorylation and cell size decrease observed after REDD1 overexpression or after rapamycin 20nM treatment were similar at 6 hours (data not shown). Thus, our hypothesis that inhibition of mTORC1 pathway via REDD1 induction is a possible mechanism of bortezomib resistance in myeloma is reinforced by these published data.

However, several data described an anti apoptotic effect of mTORC1 suggesting that mTORC1 could be a target for cancer therapy[7-9, 34], and mTOR inhibitors has been proposed in several pathological situations. Based on several preclinical research lines, the

interest in mTORC1 as a potential target of inhibition in cancer therapy, and particularly in the hematologic malignancies, is increasing. Inhibitors such as rapamycin and its derivatives sirolimus (CCL-779) restrain cell growth and proliferation of many tumor cell lines in culture. The proof of principle that mTOR inhibitors can improve cancer patient survival has been recently obtained from a large randomized trial in advanced poor prognostic renal cell carcinoma[40]. Not all tumor types respond to mTOR inhibitors[7, 8, 34]. Their effects appeared to be dependant of activation of PI3-K/AKT pathway or PTEN status (a negative regulator of PI3-K/AKT pathway) and high sensitivity to mTOR inhibitors has been observed in PTEN-deficient brain, prostate, breast and myeloma cells [41-44]. mTOR inhibitors have shown significant potential in multiple myeloma. mTOR inhibitors were shown to sensitize multiple myeloma cells to dexamethasone-induced apoptosis [45, 46]. Moreover, the combination of mTOR inhibitors and CC-5013 (Revlimid) was shown to have synergistic activity in multiple myeloma[47].

In conclusion, our results identify a novel possible mechanism of bortezomib resistance mediated by REDD1 overexpression involving inhibition of mTORC1 activity and suggest that the use of mTOR inhibitors in myeloma patients could be deleterious. Since there is controversial data about the potential interest of combination with mTOR inhibitors and bortezomib for treatment of multiple myeloma, further studies are necessary to clearly establish the potential clinical benefit of this combination.

### **Conflict of interest**

OD received a grant from Janssen-Cilag SA (Issy les Moulinaux, France). Other authors have no conflict of interest to declare.

### **Acknowledgments**

OD was supported by a grant from SNFMI (Société Nationale Française de Médecine Interne).

We thank Mrs Magali Martin, Emilie Ollivier and Nathalie Roi, for excellent technical expertise.

## References

1. P. G. Richardson, P. Sonneveld, M. W. Schuster, D. Irwin, E. A. Stadtmauer, T. Facon, J. L. Harousseau, D. Ben-Yehuda, S. Lonial, H. Goldschmidt, D. Reece, J. F. San-Miguel, J. Blade, M. Boccadoro, J. Cavenagh, W. S. Dalton, A. L. Boral, D. L. Esseltine, J. B. Porter, D. Schenkein, K. C. Anderson, Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma, *N Engl J Med.* 352 (2005) 2487-98.
2. S. Jagannath, B. G. Durie, J. Wolf, E. Camacho, D. Irwin, J. Lutzky, M. McKinley, E. Gabayan, A. Mazumder, D. Schenkein, J. Crowley, Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma, *Br J Haematol.* 129 (2005) 776-83.
3. J. L. Harousseau, C. Mathiot, M. Attal, G. Marit, D. Caillot, M. Mohty, C. Hullin, T. Facon, I. Webb, P. Moreau, VELCADE/Dexamethasone (Vel/D) Versus VAD as Induction Treatment Prior to Autologous Stem Cell Transplantation (ASCT) in Newly Diagnosed Multiple Myeloma (MM): Updated Results of the IFM 2005/01 Trial., *Blood.* 110 (2007) a450.
4. K. Bommert, R. C. Bargou, T. Stuhmer, Signalling and survival pathways in multiple myeloma, *Eur J Cancer.* 42 (2006) 1574-80.
5. F. Pene, Y. E. Claessens, O. Muller, F. Viguie, P. Mayeux, F. Dreyfus, C. Lacombe, D. Boscary, Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma, *Oncogene.* 21 (2002) 6587-97.
6. H. Yasui, T. Hideshima, P. G. Richardson, K. C. Anderson, Novel therapeutic strategies targeting growth factor signalling cascades in multiple myeloma, *Br J Haematol.* 132 (2006) 385-97.
7. G. G. Chiang, R. T. Abraham, Targeting the mTOR signaling network in cancer, *Trends Mol Med.* 13 (2007) 433-42.
8. S. Faivre, G. Kroemer, E. Raymond, Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents, *Nat Rev Drug Discov.* 5 (2006) 671-88.
9. D. A. Guertin, D. M. Sabatini, An expanding role for mTOR in cancer, *Trends Mol Med.* 11 (2005) 353-61.
10. C. S. Mitsiades, N. S. Mitsiades, C. J. McMullan, V. Poulaki, R. Shringarpure, M. Akiyama, T. Hideshima, D. Chauhan, M. Joseph, T. A. Libermann, C. Garcia-Echeverria, M. A. Pearson, F. Hofmann, K. C. Anderson, A. L. Kung, Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors, *Cancer Cell.* 5 (2004) 221-30.
11. N. Mitsiades, C. S. Mitsiades, V. Poulaki, D. Chauhan, G. Fanourakis, X. Gu, C. Bailey, M. Joseph, T. A. Libermann, S. P. Treon, N. C. Munshi, P. G. Richardson, T. Hideshima, K. C. Anderson, Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (2002) 14374-9.

12. R. Bataille, G. Jigo, N. Robillard, S. Barille-Nion, J. L. Harousseau, P. Moreau, M. Amiot, C. Pellat-Deceunynck, The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy, *Haematologica*. 91 (2006) 1234-40.
13. P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*. 162 (1987) 156-9.
14. F. Magrangeas, V. Nasser, H. Avet-Loiseau, B. Loric, O. Decaux, S. Granjeaud, F. Bertucci, D. Birnbaum, C. Nguyen, J. L. Harousseau, R. Bataille, R. Houlgatte, S. Minvielle, Gene expression profiling of multiple myeloma reveals molecular portraits in relation to the pathogenesis of the disease, *Blood*. 101 (2003) 4998-5006.
15. O. Decaux, L. Lode, F. Magrangeas, C. Charbonnel, W. Gouraud, P. Jezequel, M. Attal, J. L. Harousseau, P. Moreau, R. Bataille, L. Campion, H. Avet-Loiseau, S. Minvielle, Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: a study of the Intergroupe Francophone du Myelome, *J Clin Oncol*. 26 (2008) 4798-805.
16. V. G. Tusher, R. Tibshirani, G. Chu, Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98 (2001) 5116-21.
17. C. D. Bortner, M. I. Sifre, J. A. Cidlowski, New approaches for determining apoptotic volume decrease in cells, *Methods Enzymol*. 428 (2007) 161-81.
18. Z. Wang, M. H. Malone, M. J. Thomenius, F. Zhong, F. Xu, C. W. Distelhorst, Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals, *J Biol Chem*. 278 (2003) 27053-8.
19. A. Sofer, K. Lei, C. M. Johannessen, L. W. Ellisen, Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1, *Mol Cell Biol*. 25 (2005) 5834-45.
20. R. Schwarzer, D. Tondera, W. Arnold, K. Giese, A. Klippel, J. Kaufmann, REDD1 integrates hypoxia-mediated survival signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase, *Oncogene*. 24 (2005) 1138-49.
21. L. Lin, T. M. Stringfield, X. Shi, Y. Chen, Arsenite induces a cell stress-response gene, RTP801, through reactive oxygen species and transcription factors Elk-1 and CCAAT/enhancer-binding protein, *Biochem J*. 392 (2005) 93-102.
22. J. Brugarolas, K. Lei, R. L. Hurley, B. D. Manning, J. H. Reiling, E. Hafen, L. A. Witters, L. W. Ellisen, W. G. Kaelin, Jr., Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex, *Genes Dev*. 18 (2004) 2893-904.
23. L. W. Ellisen, K. D. Ramsayer, C. M. Johannessen, A. Yang, H. Beppu, K. Minda, J. D. Oliner, F. McKeon, D. A. Haber, REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species, *Mol Cell*. 10 (2002) 995-1005.

24. L. Lin, Y. Qian, X. Shi, Y. Chen, Induction of a cell stress response gene RTP801 by DNA damaging agent methyl methanesulfonate through CCAAT/enhancer binding protein, *Biochemistry*. 44 (2005) 3909-14.
25. S. Gery, D. J. Park, P. T. Vuong, R. K. Virk, C. I. Muller, W. K. Hofmann, H. P. Koeffler, RTP801 is a novel retinoic acid-responsive gene associated with myeloid differentiation, *Exp Hematol*. 35 (2007) 572-8.
26. T. Shoshani, A. Faerman, I. Mett, E. Zelin, T. Tenne, S. Gorodin, Y. Moshel, S. Elbaz, A. Budanov, A. Chajut, H. Kalinski, I. Kamer, A. Rozen, O. Mor, E. Keshet, D. Leshkowitz, P. Einat, R. Skaliter, E. Feinstein, Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis, *Mol Cell Biol*. 22 (2002) 2283-93.
27. M. P. DeYoung, P. Horak, A. Sofer, D. Sgroi, L. W. Ellisen, Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling, *Genes Dev*. 22 (2008) 239-51.
28. H. Wang, N. Kubica, L. W. Ellisen, L. S. Jefferson, S. R. Kimball, Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1, *J Biol Chem*. 281 (2006) 39128-34.
29. D. C. Fingar, S. Salama, C. Tsou, E. Harlow, J. Blenis, Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E, *Genes Dev*. 16 (2002) 1472-87.
30. D. Chauhan, P. Pandey, A. Ogata, G. Teoh, S. Treon, M. Urashima, S. Kharbanda, K. C. Anderson, Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism, *Oncogene*. 15 (1997) 837-43.
31. M. N. Corradetti, K. Inoki, K. L. Guan, The stress-induced proteins RTP801 and RTP801L are negative regulators of the mammalian target of rapamycin pathway, *J Biol Chem*. 280 (2005) 9769-72.
32. J. H. Reiling, E. Hafen, The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*, *Genes Dev*. 18 (2004) 2879-92.
33. K. Inoki, M. N. Corradetti, K. L. Guan, Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease, *Nat Genet*. 37 (2005) 19-24.
34. R. T. Abraham, J. J. Gibbons, The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy, *Clin Cancer Res*. 13 (2007) 3109-14.
35. I. Ruvinsky, N. Sharon, T. Lerer, H. Cohen, M. Stolovich-Rain, T. Nir, Y. Dor, P. Zisman, O. Meyuhas, Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis, *Genes Dev*. 19 (2005) 2199-211.
36. M. Ohanna, A. K. Sobering, T. Lapointe, L. Lorenzo, C. Praud, E. Petroulakis, N. Sonenberg, P. A. Kelly, A. Sotiropoulos, M. Pende, Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control, *Nat Cell Biol*. 7 (2005) 286-94.

37. C. Fumarola, S. La Monica, R. R. Alfieri, E. Borra, G. G. Guidotti, Cell size reduction induced by inhibition of the mTOR/S6K-signaling pathway protects Jurkat cells from apoptosis, *Cell Death Differ.* 12 (2005) 1344-57.
38. C. S. Mitsiades, N. Mitsiades, V. Poulaki, R. Schlossman, M. Akiyama, D. Chauhan, T. Hideshima, S. P. Treon, N. C. Munshi, P. G. Richardson, K. C. Anderson, Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications, *Oncogene.* 21 (2002) 5673-83.
39. Y. Shi, H. Yan, P. Frost, J. Gera, A. Lichtenstein, Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade, *Mol Cancer Ther.* 4 (2005) 1533-40.
40. E. Raymond, J. Alexandre, S. Faivre, K. Vera, E. Materman, J. Boni, C. Leister, J. Korth-Bradley, A. Hanauske, J. P. Armand, Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer, *J Clin Oncol.* 22 (2004) 2336-47.
41. M. S. Neshat, I. K. Mellingshoff, C. Tran, B. Stiles, G. Thomas, R. Petersen, P. Frost, J. J. Gibbons, H. Wu, C. L. Sawyers, Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (2001) 10314-9.
42. J. F. Gera, I. K. Mellingshoff, Y. Shi, M. B. Rettig, C. Tran, J. H. Hsu, C. L. Sawyers, A. K. Lichtenstein, AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression, *J Biol Chem.* 279 (2004) 2737-46.
43. P. Frost, Y. Shi, B. Hoang, A. Lichtenstein, AKT activity regulates the ability of mTOR inhibitors to prevent angiogenesis and VEGF expression in multiple myeloma cells, *Oncogene.* 26 (2007) 2255-62.
44. Y. Shi, J. Gera, L. Hu, J. H. Hsu, R. Bookstein, W. Li, A. Lichtenstein, Enhanced sensitivity of multiple myeloma cells containing PTEN mutations to CCI-779, *Cancer Res.* 62 (2002) 5027-34.
45. H. Yan, P. Frost, Y. Shi, B. Hoang, S. Sharma, M. Fisher, J. Gera, A. Lichtenstein, Mechanism by which mammalian target of rapamycin inhibitors sensitize multiple myeloma cells to dexamethasone-induced apoptosis, *Cancer Res.* 66 (2006) 2305-13.
46. T. Stromberg, A. Dimberg, A. Hammarberg, K. Carlson, A. Osterborg, K. Nilsson, H. Jernberg-Wiklund, Rapamycin sensitizes multiple myeloma cells to apoptosis induced by dexamethasone, *Blood.* 103 (2004) 3138-47.
47. N. Raje, S. Kumar, T. Hideshima, K. Ishitsuka, D. Chauhan, C. Mitsiades, K. Podar, S. Le Gouill, P. Richardson, N. C. Munshi, D. I. Stirling, J. H. Antin, K. C. Anderson, Combination of the mTOR inhibitor rapamycin and CC-5013 has synergistic activity in multiple myeloma, *Blood.* 104 (2004) 4188-93.

**Table 1:** List of genes with significantly induced or repressed expression after bortezomib-dexamethasone exposure during 6 hours. Genes products known to be associated with stress response pathway are highlighted.

Gene description	Symbol	Fold change
Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14C	PPP1R14C	204.62
Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	GCLM	98.59
<b>Heat shock 70kDa protein 1A</b>	<b>HSPA1A</b>	<b>65.14</b>
Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13	KCNJ13	63.15
<b>Heat shock 70kDa protein 1B</b>	<b>HSPA1B</b>	<b>57.02</b>
<b>DNA-damage-inducible transcript 3</b>	<b>DDIT3</b>	<b>55.15</b>
<b>Regulated in development and DNA damage responses 1</b>	<b>REDD1</b>	<b>19.42</b>
Hypothetical protein MGC12103	LOC133619	12.10
<b>Heat shock 70kDa protein 1-like</b>	<b>HSPA1L</b>	<b>11.35</b>
Adaptor-related protein complex 4, beta 1 subunit	AP4B1	10.68
<b>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1</b>	<b>DNAJB1</b>	<b>9.82</b>
ADP-ribosylhydrolase like 2	ADPRHL2	8.45
Amine oxidase, copper containing 2 (retina-specific)	AOC2	4.12
Zinc finger, AN1-type domain 5	ZFAND5	2.67
Ubiquitin C	UBC	2.19
<b>Sequestosome 1</b>	<b>SQSTM1</b>	<b>2.19</b>
Chromosome 19 open reading frame 7	C19orf7	0.46
Small nuclear ribonucleoprotein 70kDa polypeptide (RNP antigen)	SNRP70	0.36
Proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein	PRELP	0.36
Armadillo repeat containing 1	ARMC1	0.27
Centromere protein A, 17kDa	CENPA	0.26
Opa interacting protein 5	OIP5	0.25
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 1	MAP3K7IP1	0.20
KIAA1553	KIAA1553	0.15
AT rich interactive domain 1B (SWI1-like)	ARID1b	0.15

### Legends to figures

**Figure 1: Time course of *REDD1* induction in response to bortezomib-dexamethasone.** U266 cells were treated with bortezomib 10 nM and dexamethasone 1  $\mu$ M for the indicated time. **A.** Quantitative RT-PCR of *REDD1* mRNA normalized to the mRNA level of *Actin*. **B.** Western blotting analysis of *REDD1* protein expression. Actin was included as a protein loading control.

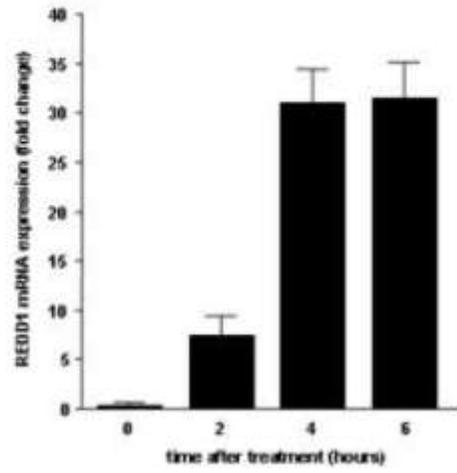
**Figure 2: *REDD1* induction is correlated with viability and cell size.** Three cell lines were explored: LPI, U266 and MDN. **A.** Quantitative RT-PCR of *REDD1* mRNA normalized to the mRNA level of *Actin* after 6 hours exposure to bortezomib (10 nM) – dexamethasone (1  $\mu$ M). **B.** Percentage of apoptosis was measured after 24 hours exposure to treatment by APO2.7-PE staining using flow cytometry. **C.** Cell size was measured at 6 hours and expressed relative to control cell size.

**Figure 3: *REDD1* overexpression is associated with inhibition of mTORC1 activity.** U266 cells were treated with dexamethasone 1  $\mu$ M or bortezomib 10 nM alone or in combination for 6 hours. Western blotting analysis of *REDD1* protein expression and p70 S6K phosphorylation. Actin was included as a protein loading control.

**Figure 4: SiRNA-mediated silencing of *REDD1* induction inhibits cell size decrease and enhances sensitivity to treatment.** U266 cells were electroporated with siRNA targeting *REDD1* (siREDD1) or siRNA control (siControl). After 2 hours of culture, cells were treated with 10 nM bortezomib and 1  $\mu$ M dexamethasone. **A.** Western blotting analysis of *REDD1* protein expression and p70 S6K phosphorylation after 6 hours exposure to treatment. Actin was included as a protein loading control. **B.** Cell size measurement after 6 hours of treatment (results represent the mean of 3 independent experiments  $\pm$  standard error. \* $p$ <0.05 vs control, \*\*NS vs control). **C.** Effects of siREDD1 on cell viability after exposure to bortezomib-dexamethasone. Cell viability was evaluated after 24 hours exposure to bortezomib - dexamethasone.

**Figure 1**

**A**



**B**

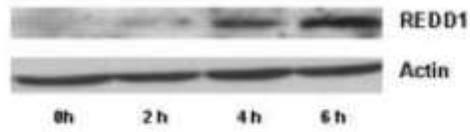


Figure 2

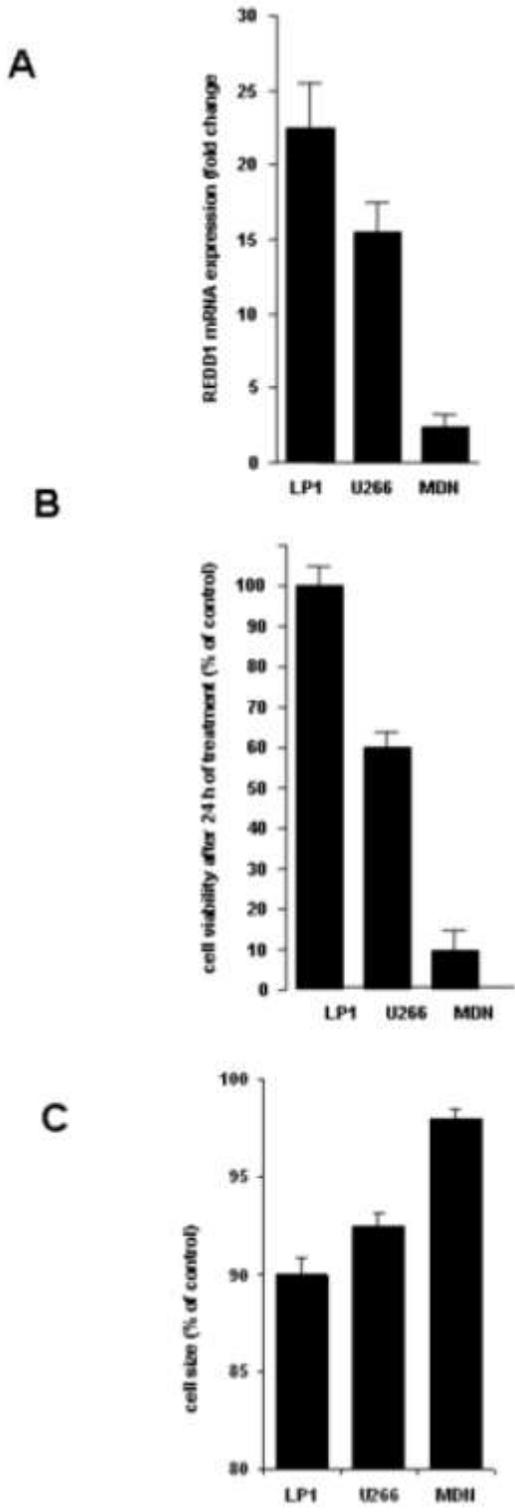


Figure 3

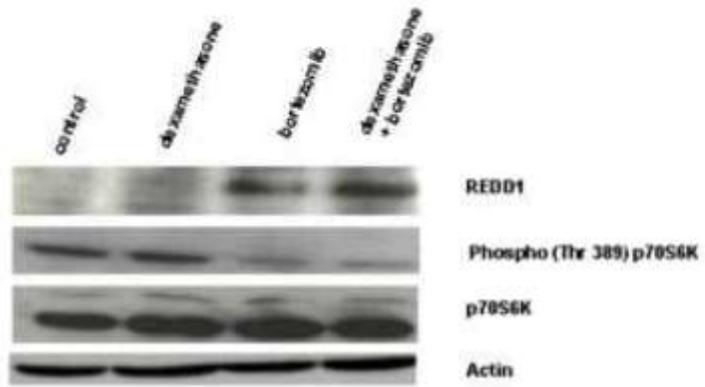
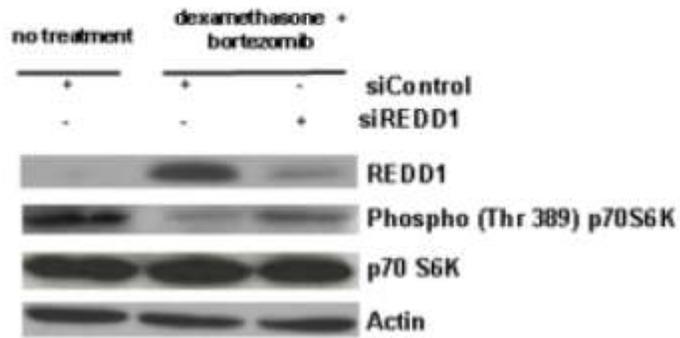
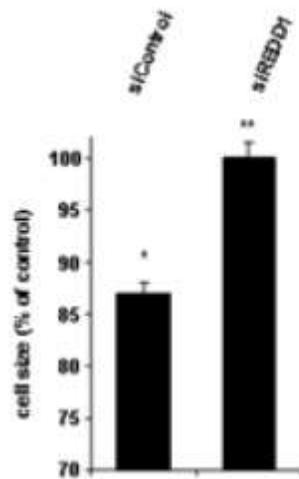


Figure 4

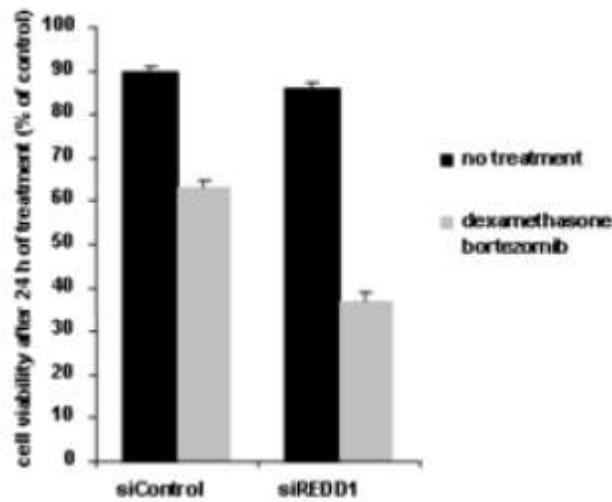
A



B



C



## VI. Discussion

Depuis plusieurs années, la recherche de biomarqueurs pronostiques est un des enjeux de recherche dans les pathologies malignes. D'ailleurs, le développement des biomarqueurs et de la recherche translationnelle ainsi que le transfert rapide des connaissances vers la clinique sont des objectifs décrits par le Pr Grünfeld dans son rapport remis récemment au Président de la République en prévision du prochain Plan Cancer ([http://www.e-cancer.fr/v1/fichiers/public/rapport\\_grunfeld\\_104pages\\_srm\\_mars\\_2009\\_v3.pdf](http://www.e-cancer.fr/v1/fichiers/public/rapport_grunfeld_104pages_srm_mars_2009_v3.pdf)).

Certains biomarqueurs puissants sont des témoins de l'activité de la maladie, d'autres sont corrélés à la masse tumorale. Les anomalies génétiques occupent une place de choix dans les biomarqueurs car elles sont liées au clone tumoral et permettent de différencier des tumeurs pourtant similaires dans leur présentation clinique, biologique ou leur morphologie, leur histologie (Alizadeh et al, 2000). Dans le myélome, il existe une instabilité génétique responsable de multiples anomalies chromosomiques. L'identification des anomalies chromosomiques ayant un réel poids pronostique au sein de ce « bruit de fond » génétique est difficile. Ainsi, alors que la délétion du chromosome 13 a été longtemps considérée comme un facteur pronostique majeur dans le myélome, les données récentes de l'IFM indiquent que le poids pronostique de la del13 est lié à son association avec la délétion du 17 et la t(4;14) (Avet-Loiseau et al, 2007). Malgré ces difficultés, les analyses de cytogénétique conventionnelle et de FISH ont permis d'identifier des anomalies chromosomiques de mauvais pronostic (del17, t(4;14),...) et ont démontré le poids de la génétique dans le pronostic du myélome.

Les techniques de génomique permettent de faire une analyse globale et de s'affranchir du « bruit de fond » de l'instabilité génétique du myélome. Les premières analyses ont étudié le transcriptome par analyse des profils d'expression génique. Les études menées depuis plusieurs années ont permis de démontrer :

- la faisabilité des analyses des profils d'expression génique de plasmocytes médullaires malins sur de larges cohortes de patients en monocentrique et en multicentrique.

- la reproductibilité des études de profils d'expression génique malgré des différences techniques entre les différents laboratoires.
- l'hétérogénéité génétique du myélome avec proposition de classifications moléculaires du myélome.
- la capacité des études des profils d'expression génique à identifier des marqueurs moléculaires pronostiques permettant de proposer des scores prédictifs de la survie ou de la réponse aux traitements.

Un des apports importants des analyses des profils d'expression génique est d'avoir poussé plus loin la description de l'hétérogénéité génétique du myélome qui avait déjà été esquissée par les études cytogénétiques. Ces études ont démontré que des groupes apparemment homogènes sur les données cytogénétiques pouvaient être séparés en plusieurs sous groupes ayant des pronostics très différents. L'autre impact important des analyses de génomique est d'apporter de nouvelles connaissances sur la physiopathologie du myélome.

Pour autant, contrairement à ce qui est observé dans les tumeurs solides (cancer du sein principalement), l'application de ces techniques en clinique n'est pas encore d'actualité. Les recommandations récentes d'un groupe d'experts, présentées au dernier Myeloma Workshop en mars 2009 (<http://www.mw-delhi09.com/spargoDocs/Consensuspaneltwo.pdf>), indiquent que des études complémentaires sont nécessaires et que les analyses de génomique ne peuvent, pour le moment, pas être utilisées en routine pour l'évaluation du pronostic des patients. Les freins à l'utilisation des techniques de génomique dans la pratique clinique de routine sont nombreux.

- Le premier frein est technique, lié aux contraintes multiples imposées par ces méthodes à toutes les étapes (purification, qualité de l'ARN,...) et qui conduisent à ne pouvoir utiliser qu'une partie des prélèvements reçus.
- Le deuxième frein souvent évoqué est le manque de reproductibilité. Une étude de contrôle de qualité des puces à ADN, conduite par la FDA, a démontré le contraire dans les laboratoires qui respectent les bonnes pratiques scientifiques (Shi et al, 2006). Par ailleurs, la généralisation des puces commerciales et la standardisation des analyses permettent d'assurer une bonne reproductibilité des analyses.

- Enfin, pour être accepté en clinique, un biomarqueur doit subir plusieurs étapes de validations rétrospectives et prospectives afin de prouver son impact pronostique et son intérêt pour la prise en charge thérapeutique des patients. Le processus de validation d'un biomarqueur doit idéalement suivre les mêmes étapes que celles d'un nouveau traitement (Minvielle 2007). Alors que de nombreux biomarqueurs tels que le taux de  $\beta 2m$  ont été identifiés dans le myélome depuis plusieurs années, aucun d'entre eux n'a été, à ce jour, utilisé pour proposer une modification de la stratégie thérapeutique.

Les analyses du transcriptome ont été les premières études de génomique à être développées. Depuis quelques années, des analyses à l'échelle du génome sont disponibles, permettant d'étudier les variations du nombre de copies et offrent la possibilité d'établir de véritables caryotypes médullaires (Baron et al, 2007). Ces techniques permettent d'identifier de nouvelles anomalies chromosomiques ayant un poids pronostique important.

## **VI.1 Apports des analyses de génomique transcriptionnelle**

### **VI.1.1 Apports des profils d'expression génique par rapport à la cytogénétique**

Dans un premier temps, les études de profils d'expression génique se sont appuyées sur les anomalies cytogénétiques connues pour asseoir leur validité. Ainsi, l'étude de Bergsagel (Bergsagel et al, 2005) a montré que les profils d'expression génique permettaient de classer les myélomes sur la base de l'expression des cyclines et des translocations 14q32. Par ailleurs, les 7 sous groupes de la classification moléculaire décrite par Zhan étaient liés à l'expression de gènes impliqués dans les translocations 14q32 (FGFR3, CCND1, MAF,...) ou à l'hyperdiploïdie (Zhan et al, 2006). Secondairement, plusieurs études ont démontré que les profils d'expression génique permettent d'aller plus dans les détails de la description de l'hétérogénéité génétique du myélome que les analyses cytogénétiques conventionnelles ou en FISH. Les profils d'expression génique apportent un degré de complexité complémentaire là où la cytogénétique voyait un groupe homogène de patients. Ainsi plusieurs auteurs ont démontré que les myélomes hyperdiploïdes pouvaient être séparés en plusieurs groupes différents en termes de survie, de réponse au traitement.

Une hyperdiploïdie est observée dans 50 à 60% des myélomes et associée à un pronostic favorable. Cependant, des patients hyperdiploïdes ont une survie courte, ce qui illustre l'hétérogénéité de groupe des patients hyperdiploïdes. Chng a cherché à appréhender l'hétérogénéité de l'hyperdiploïdie (Chng et al, 2007). Il a comparé les profils d'expression génique de 53 myélomes hyperdiploïdes et de 37 myélomes non hyperdiploïdes et identifié 413 gènes discriminants dont environ un tiers était lié à la synthèse protéique. Par une analyse réursive, 4 groupes de myélomes hyperdiploïdes ayant des signatures d'expression mutuellement exclusive ont été identifiés.

- groupe 1 caractérisé par l'expression importante d'antigène de cancer testiculaire et de gènes liés à la mitose et la prolifération
- groupe 2 caractérisé par une expression de l'IL6 et du HGF hepatocyte growth factor
- groupe 3 caractérisé par l'expression de gènes liés à NFKB et antiapoptotique
- groupe 4 qui n'exprime aucun des gènes précédents

Ces 4 groupes ont été validés sur deux autres cohortes de patients. La répartition des patients entre les 4 groupes était la même au diagnostic ou en rechute. Les 4 groupes avaient des survies différentes avec des médianes de survie respectivement à 27 mois pour le groupe 1, non atteinte pour le groupe 2, 122 mois pour le groupe 3 et 49 mois pour le groupe 4. Le groupe 3 étant caractérisé par une expression de gènes liés à NFKB, cible du bortezomib, les auteurs ont recherché un lien entre ce groupe et la réponse au traitement. Ils ont étudié une cohorte de 63 patients inclus dans l'essai APEX comparant en rechute le bortezomib (29 patients) à la dexaméthasone (34 patients). Le groupe 3 était associé à une sensibilité supérieure au bortezomib par rapport aux autres groupes (taux de réponse 70% contre 29% -  $p=0,0002$ ). La survie sans progression des patients traités par bortezomib était plus longue pour les patients du groupe 3 que pour les 3 autres groupes (médiane 253 jours contre 90 jours  $p 0,0002$ ). En revanche, la sensibilité à la dexaméthasone était comparable entre le groupe 3 et les autres groupes.

Dans une étude combinant analyse des variations du nombre de copies par CGH arrays et profils d'expression génique, Carrasco (Carrasco et al, 2006) a montré que, parmi les myélomes hyperdiploïdes, la présence d'une trisomie 11 en l'absence d'une del13 et d'un gain de 1q était associée à un meilleur pronostic.

Par ailleurs, Chng a montré que le score UAMS permettait d'identifier deux groupes au sein des patients ayant une t(4;14) (Chng et al, 2008).

### **VI.1.2 Amélioration des connaissances de la physiopathologie du myélome**

Les premières études des profils d'expression génique dans le myélome ont cherché à identifier des gènes associés différenciant les plasmocytes normaux et malins ou impliqués dans l'oncogenèse du myélome. Depuis, la corrélation des données d'expression avec les données cliniques et évolutives des patients a permis de proposer des scores prédictifs de la survie. Ces deux étapes illustrent les deux approches possibles des techniques de génomique. L'une est une approche de recherche fondamentale dont le but est d'améliorer les connaissances de la physiologie de la maladie. L'autre est plus clinique, orientée vers la recherche de marqueurs prédictifs. Il n'y a pas d'antinomie entre ces deux approches et les échantillons étudiés peuvent être les mêmes.

Dans les études à visée clinique, l'objectif principal est l'identification d'un prédicteur. L'aspect scientifique est au second plan. Dans la majorité des cas, les gènes associés au pronostic n'ont pas de lien direct avec la physiopathologie et ne permettent pas de comprendre leur lien avec le pronostic. Cela ne doit pas remettre en cause la pertinence des prédicteurs identifiés (Quackenbush 2006). Retirer des connaissances biologiques des analyses de profils d'expression génique est un challenge. Deux approches peuvent être utilisées, l'une gène par gène et l'autre, basée sur des groupes de gènes reliés par une fonction biologique, un processus cellulaire,...

#### ***VI.1.2.1 Approche gène par gène***

L'approche gène par gène consiste à analyser la liste des gènes discriminants en essayant de trouver un lien possible entre chacun des gènes et une fonction impliquée dans la physiologie plasmocytaire. C'est l'approche que nous avons eue dans notre travail sur la recherche de mécanismes de résistance des lignées cellulaires à l'association bortezomib-dexaméthasone. Les différentes étapes ont été :

- Validation *in silico* qui consiste à confronter la liste des gènes avec les données de la littérature et à essayer de trouver une cohérence, un schéma permettant de relier les données d'expression et des effets biologiques décrits.
- Etudes ciblées des gènes d'intérêt : vérification des données d'expression, étude de l'expression à l'échelle de la protéine, cinétique d'induction,...
- Etudes fonctionnelles avec, par exemple, utilisation des techniques d'interférences d'ARN (siRNA) pour inhiber l'expression du gène et observer les effets de cette inhibition.

### **VI.1.2.2 « Gene set enrichment analysis » (GSEA)**

L'autre approche, baptisée « gene set enrichment analysis » (GSEA) consiste à prendre le problème en sens inverse (Subramanian et al, 2005). Cette analyse utilise des groupes de gènes (reliés par des processus cellulaires, des fonctions biologiques, des caractéristiques chromosomiques, ...) et recherche si l'expression de ces gènes est dérégulée de manière similaire entre deux groupes échantillons (par exemple entre les patients de bon et de mauvais pronostic). Cette méthode permet une analyse plus biologique des profils d'expression génique qui n'est plus basée uniquement sur des listes de gènes sans lien entre eux. Alors que l'analyse « gène par gène » trouve parfois peu de similitudes entre deux études indépendantes, le GSEA permet de mettre en évidence des anomalies communes. Nous avons utilisé cette approche dans notre étude prédictive et avons pu ainsi démontrer que la biologie des myélomes à haut et à faible risque est différente. Nous avons notamment identifié un enrichissement de gènes dans la signature de mauvais pronostic qui pourrait expliquer, en partie, l'instabilité génétique du myélome.

## **VI.2 Obstacles au développement de ces techniques**

### **VI.2.1 Obstacles techniques**

Une des limites des profils d'expression génique était le manque de standardisation des analyses à toutes les étapes. Avec les progrès technique et la généralisation des puces commerciales, ces problèmes deviennent moins importants. Cependant, un contrôle rigoureux à chaque étape, du prélèvement jusqu'à l'analyse statistique finale est nécessaire pour assurer la qualité des résultats.

### **VI.2.1.1 Purification des plasmocytes et vérification de la pureté**

La purification des cellules est indispensable afin d'éviter une contamination des signatures d'expression par des cellules non plasmocytaires. Dans toutes les études menées par notre équipe, le traitement des échantillons médullaires était centralisé et effectué dans le laboratoire d'Hématologie du CHU de Nantes. Après réception du prélèvement (transport rapide à température ambiante), les cellules mononuclées de la moelle osseuse sont séparées par centrifugation en gradient de Ficoll. Les plasmocytes sont ensuite triés au moyen de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD138, spécifique des plasmocytes dans la moelle osseuse, permettant l'obtention d'une pureté supérieure à 90%. Cette étape de tri est un élément incontournable de la procédure. En effet, le pourcentage médian de plasmocytes après Ficoll est d'environ 6%. Après purification, la pureté en plasmocytes est analysée en cytologie et un taux de pureté supérieur à 90% est exigé. Cette procédure a été validée sur plus de 4 000 prélèvements effectués dans l'ensemble des centres de l'IFM.

Dans les études de l'équipe de Shaughnessy, la méthode de purification était la même (Zhan et al, 2006; Shaughnessy et al, 2007). En revanche, l'évaluation de la pureté était faite par cytométrie en flux. Dans l'étude de Mulligan (Mulligan et al, 2007), la purification était faite par enrichissement (sélection négative), localement dans chaque centre. L'évaluation de la pureté était centralisée et basée sur les données d'expression par calcul d'un rapport entre l'expression de gènes spécifiques des plasmocytes et de gènes spécifiques de cellules érythroïdes, neutrophiles et T. La corrélation entre ce score et le pourcentage de plasmocytes réellement présent dans l'échantillon est difficile. À la vue des données fournies par les auteurs, il semble qu'une pureté de 84% permettait d'obtenir un score de pureté suffisant pour conserver l'échantillon.

Ces différences de méthodes utilisées pour la purification et surtout pour la vérification de la pureté finale peuvent biaiser les résultats. Ainsi, Chng a remis en cause les résultats de Zhan concernant la signature « MGUS » (Chng et al, 2007).

- Dans la cohorte d'entraînement de 351 patients analysée par Zhan, 95 échantillons exprimaient une signature myéloïde témoignant de la probable contamination par des cellules non malignes. Ces échantillons n'ont pas été exclus de l'analyse dans l'article sur la signature « MGUS » (Zhan et al, 2002). Chng a réanalysé les données de survie en excluant les 95 échantillons contaminés. Sur les 256 myélomes restants (76 « myélome-MGUS »,

180 « myélome non MGUS »), il ne trouvait pas de différence de survie entre les deux groupes de myélomes.

- Chng a utilisé la signature « MGUS » pour analyser une cohorte indépendante de patients de la Mayo Clinic. Aucun des myélomes de cette cohorte n'exprimaient la signature « MGUS ».
- Par ailleurs, sur une nouvelle analyse des données de Zhan, Chng a mis en évidence une surexpression de gènes de la signature des plasmocytes normaux polyclonaux dans les MGUS. Ce résultat témoigne de la contamination des échantillons de MGUS par des plasmocytes normaux. La contamination des prélèvements est une des difficultés importantes de l'étude des MGUS. La coexistence de plasmocytes médullaires normaux et monoclonaux nécessite l'étude phénotypique des plasmocytes avant hybridation. Dans l'étude de Zhan, cette donnée n'était pas disponible.

Les critiques de Chng illustrent l'importance qu'il faut apporter à la purification des échantillons et à la vérification de la pureté avant hybridation sur les puces. Une standardisation des méthodes de purification et de l'évaluation de la pureté est indispensable. Par ailleurs, elles soulignent l'importance d'effectuer une validation externe des données issues des profils d'expression génique sur des cohortes extérieures indépendantes. Les validations internes sur des cohortes de validation ne suffisent pas à valider des résultats.

### ***VI.2.1.2 Vérification de la qualité de l'ARN, de l'absence de dégradation de l'ARN***

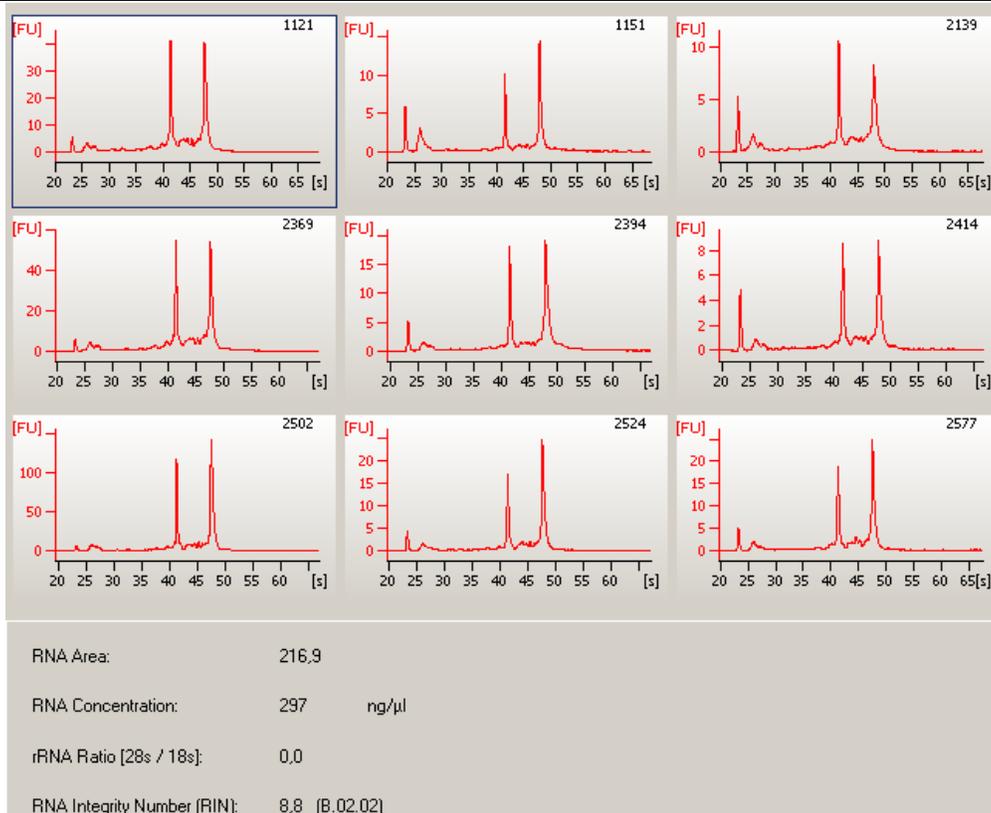
Une fois l'ARN extrait, il est important de le quantifier et d'évaluer sa qualité (niveau de dégradation, pureté). Les analyses quantitatives et qualitatives de l'ARN extrait peuvent être réalisées sur deux appareils qui ne fournissent pas les mêmes informations.

Le spectrophotomètre Nanodrop (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE) permet de mesurer la quantité d'ARN et d'évaluer sa pureté (présence de protéines, de résidus des produits d'extraction). Le Nanodrop trace une courbe d'absorbance. Les valeurs d'absorbance analysées sont 260nm (ARN ou ADN), 280 nm (protéines) et 230nm (résidus de phénol ou chloroforme utilisés pour l'extraction). Les rapports 260nm/280nm et 260nm/230nm permettent d'évaluer la pureté de l'ARN face aux éventuelles protéines et/ou solutés d'extraction restant (phénol,

chloroforme). Les critères de sélection des échantillons sont : quantité > 1µg, rapport 260nm/280nm>1.9 et 260nm/230nm>1,8. Les échantillons ne répondant pas à ses critères ne doivent pas être analysés.

L'appareil Agilent 2100 bioanalyser (Agilent Technologies Palo Alto, CA) évalue la quantité d'ARN et le niveau de dégradation. La quantité est estimée par comparaison avec un marqueur (RNA 6000 ladder) déposé dans un des puits de la puce. L'analyse qualitative s'effectue dans le même temps. La qualité était initialement évaluée sur le rapport des pics 28S/18S. Un rapport 28S/18S < 1,8 témoignant d'une dégradation de l'ARN conduisait à l'exclusion de l'échantillon. Depuis, la firme Agilent a développé un score baptisé RIN (pour RNA Integrity Number) qui permet d'évaluer de manière beaucoup plus fiable la qualité de l'ARN (Schroeder et al, 2006). Les valeurs du RIN peuvent être comprises entre 1 (ARN totalement dégradé) et 10 (ARN intact).

Pour chacune de nos études, l'analyse des ARN extraits était effectuée sur l'appareil Agilent. Les tubes contenant moins de 2µg d'ARN total étaient exclus de l'étude. Par ailleurs, pour notre deuxième étude, le RIN moyen était de 9,1 (6,9 – 10) témoignant de la qualité des ARN analysés (figure 30).



**Figure 30 : Résultats de l'analyse de la qualité de l'ARN (RIN number) pour 9 prélèvements inclus dans notre étude (Decaux et al, 2008).**

Ces analyses doivent être systématiques dans les études de génomique. Pour nos études actuelles et futures, les échantillons d'ARN seront testés sur les deux appareils car cela permet une meilleure sélection des prélèvements.

### **VI.2.1.3 Types de puces**

Il existe deux procédés de fabrication des puces : le dépôt d'ADN complémentaire (ADNc) sur le support solide ou la synthèse in situ d'oligonucléotides (Baron et al, 2007).

Pour la première approche, il est nécessaire d'établir une collection de cibles spécifiques d'un grand nombre de gènes. Cette collection est réalisée à partir de banques de clones d'ADNc obtenus par transcription inverse des ARN messagers d'une cellule ou d'un tissu donné. Le séquençage de ces clones sous forme d'EST (expressed sequence tag) permet leur identification. Cela a été réalisé pour l'homme et la souris par le Consortium Image qui a déjà produit plusieurs millions de clones partiellement séquencés. Ces clones sont ensuite amplifiés par PCR, puis

déposés de façon ordonnée au moyen de robots sur un support solide en verre ou en nylon. Ces puces peuvent être fabriquées dans des laboratoires disposant de robots spotteurs. Leurs avantages sont d'une part leur flexibilité, avec la possibilité de confectionner des puces à façon contenant les gènes d'intérêt, et, d'autre part, leur coût moindre. Elles présentent également l'avantage d'une plus grande sensibilité, permettant l'utilisation de faible quantité d'ARN total (1 à 2 microgrammes) et nécessitant donc des quantités moins importantes de cellules (Bertucci et al, 1999). Leur principal inconvénient est la gestion des clones et des produits de la PCR qui nécessite une grande vigilance afin d'obtenir et de maintenir des collections en bon état (Bertucci et al, 2001).

La seconde approche est celle des puces à oligonucléotides, développées essentiellement par la société Affymetrix. Elle consiste en l'obtention d'oligonucléotides de 20- ou 25-mères, spécifiques de chaque gène, synthétisés in situ directement sur la puce. La synthèse se fait sur un support en silicium par des techniques de photolithographie issues de la technologie des microprocesseurs. Elle permet une très grande intégration des cibles, jusqu'à plusieurs centaines de milliers d'oligonucléotides différents au centimètre carré avec un potentiel maximal de miniaturisation encore très important. Le coût élevé de production rendait la technologie hors de portée des équipes de recherche. Depuis, les progrès technologiques ont permis d'une part d'augmenter le nombre d'oligonucléotides présents sur les puces permettant une étude pangénomique et d'autre part, une diminution des coûts. Actuellement, les plateformes Affymetrix se généralisent dans les laboratoires.

Notre unité a initialement utilisé la technologie développée au TAGC (INSERM ERM 206). Pour notre première étude (Magrangeas et al, 2003), les puces utilisées étaient des membranes de nylon sur lesquelles sont déposés des produits de PCR obtenus à partir de la banque de clones d'ADNc de l'ERM 206. Cette banque a été obtenue par sélection de clones EST issus de la banque d'ADNc du consortium IMAGE. Parmi les 7200 clones de la banque de l'ERM 206, 5470 clones ont été choisis afin de réaliser une puce un peu plus spécifique des plasmocytes. Pour certains gènes, plusieurs clones ont été déposés à des localisations différentes sur les membranes. Les produits déposés correspondent à la partie 3' non codante des gènes. Les puces étaient produites par l'ERM 206. La qualité des dépôts et la quantité de matériel déposé étaient vérifiées par hybridation d'une sonde oligonucléotidique (sonde vecteur) correspondant à une séquence

commune à tous les produits de PCR. Cette étape permettait de s'assurer de la régularité des dépôts sur les membranes et d'évaluer la quantité de matériel déposé.

Dans un second temps, ce type de puces a été développé au sein de l'UMGC et nos études suivantes ont été menées avec des puces produites au sein de l'UMGC à Nantes. Ces « nouvelles » puces étaient construites à partir de 17 134 séquences d'ADN complémentaires représentant environ 11 250 gènes. Cette deuxième génération de puces combinait : (1) les gènes de la première génération de puces, correspondant à environ 5 400 clones enrichis en gènes ayant un rôle suspecté en immunologie et dans les cancers, (2) 500 clones issus de la banque IMAGE et dont les transcrits distinguent la signature « centre germinatif » et « B activés » décrites par Alizadeh (Alizadeh et al, 2000), (3) environ 16 000 clones non redondants pour obtenir une couverture maximale du génome. Ces clones ont été choisis selon des critères stricts et étaient reliés en bioinformatique avec les oligonucléotides présents sur les puces Affymetrix. Notre deuxième génération de puces couvre environ 47% du génome.

#### ***VI.2.1.4 Vérification de la qualité de l'hybridation***

Sur les puces nylons et les puces Affymetrix, il existe un panel de contrôles permettant une évaluation rigoureuse de la qualité de l'hybridation.

#### **VI.2.2 Sélection des patients**

Du fait de toutes ces étapes, un certain nombre d'échantillons ne peuvent pas être pris en compte dans l'analyse finale. L'étude de Mulligan est intéressante car elle détaille parfaitement la sélection des patients à chaque étape de la préparation des échantillons (Mulligan et al, 2007).

Dans cette étude, la plasmocytose médullaire était estimée entre 5 et 75% avant enrichissement. L'évaluation de la pureté était centralisée et basée sur les données d'expression par calcul d'un rapport entre l'expression de gènes spécifiques des plasmocytes et de gènes spécifiques de cellules érythroïdes, neutrophiles et T. A chaque étape, un nombre important d'échantillons était rejeté.

- Seuls 60% des échantillons ont permis l'obtention de quantité d'ARN suffisante avec la qualité requise.
- Par la suite, 15% des échantillons hybridés ont donné un signal de mauvaise qualité.

- Enfin, parmi les échantillons ayant donné un signal de qualité, 15% n'ont pas passé le seuil de pureté.

Les contrôles réalisés à chaque étape de la qualité des prélèvements ont donc conduit à rejeter, au final, plus de la moitié des échantillons avec seulement 40% des patients finalement analysables. Les principales caractéristiques cliniques et biologiques des patients non analysés en génomique étaient identiques à celles des patients analysés. Cependant, la masse tumorale était plus élevée (ce qui est logique car c'est un des facteurs influençant la qualité des prélèvements) et l'évolution étaient plus péjorative (survie, réponse, TTP) pour les patients analysés en génomique. Le fait que, dans cette étude, les meilleurs échantillons soient ceux fortement envahis crée un biais et il n'est pas certain que les résultats soient extrapolables à l'ensemble des patients.

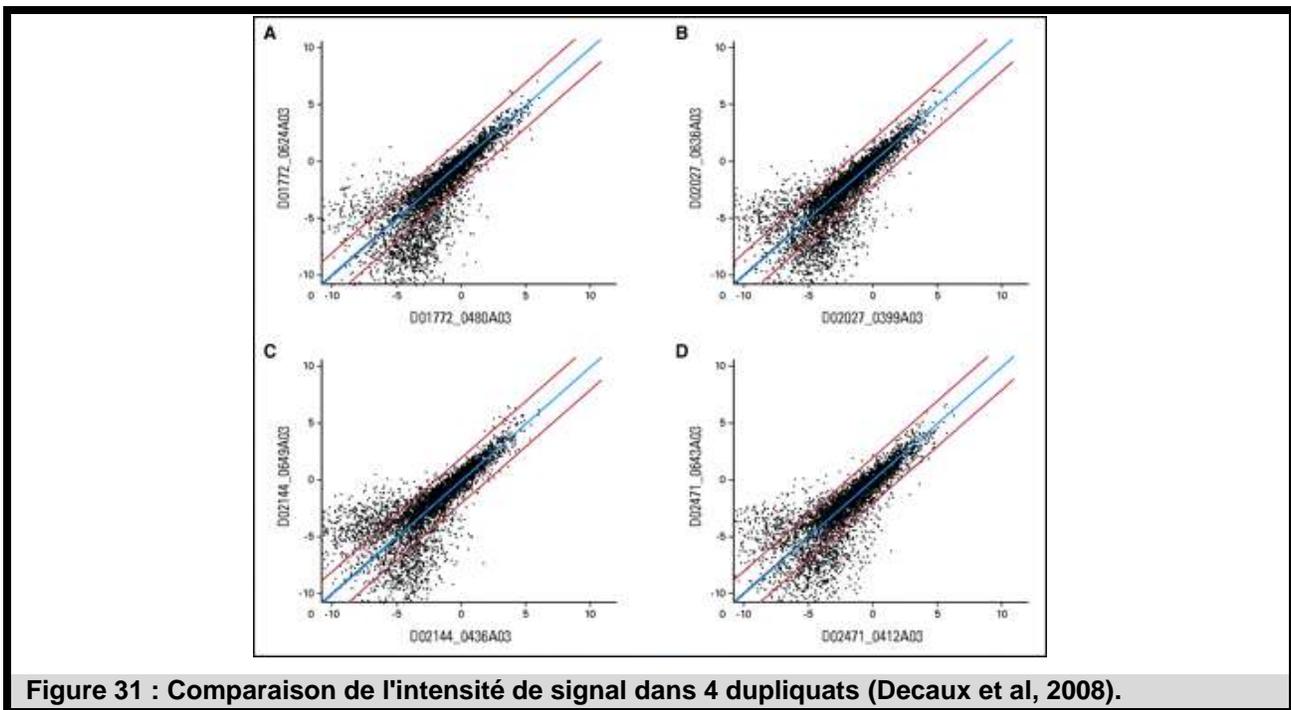
Le laboratoire d'hématologie du CHU de Nantes reçoit tous les prélèvements de myélome des patients inclus dans les protocoles IFM. Notre impression est la même avec moins de la moitié des prélèvements finalement utilisables pour des analyses de profils d'expression génique. Cela peut créer un biais dans toutes ces études de génomique et il est indispensable de vérifier que les populations étudiées sont représentatives de la cohorte globale. Dans notre étude (Decaux et al, 2008), les caractéristiques cliniques, biologiques et la survie des 250 patients analysés en profil d'expression génique étaient comparables aux 724 patients non analysés et inclus dans le même protocole clinique (figure 19).

### **VI.2.3 Reproductibilité des résultats ?**

L'utilisation de techniques différentes a longtemps fait craindre un manque de reproductibilité des études de génomique transcriptionnelle. Une étude conduite par la FDA et menée avec la collaboration de laboratoires institutionnels et privés, a démontré la reproductibilité des analyses de génomique quelque soit la plateforme utilisée. MicroArray Quality Control (MACQ project) (Shi et al, 2006). Des analyses de 4 échantillons obtenus à partir de 2 échantillons d'ARN de référence ont été testées dans plusieurs sites utilisant des technologies de puces différentes. Les analyses ont démontré une cohérence intra plateforme et une concordance inter plateforme en terme de gènes différentiels identifiés.

Pour nos études, la fiabilité et la reproductibilité de nos résultats ont été vérifiées par plusieurs méthodes :

- contrôle de l'expression des gènes d'intérêt par RT-PCR.
- vérification de la reproductibilité de nos résultats sur 4 hybridations faites en dupliquats (figure 31).
- validation du score IFM sur une cohorte de validation (validation interne).
- validation externe du score IFM sur des cohortes indépendantes de patients ayant été analysées par puces commerciales Affymetrix (cf chapitre V.7.6).



**Figure 31 : Comparaison de l'intensité de signal dans 4 dupliquats (Decaux et al, 2008).**

Depuis quelques années, notre équipe a développé une plateforme Affymetrix utilisant des puces commerciales. Cette technique présente les avantages d'être standardisée, utilisée par plusieurs laboratoires dans le monde et de permettre, sur la même plateforme, l'étude du transcriptome et des variations du nombre de copies. Par ailleurs, les progrès réguliers dans ce domaine permettent de disposer de puces de plus en plus performantes autorisant une exploration de tout le génome.

#### **VI.2.4 Question de la comparabilité entre les prédicteurs.**

Entre le score IFM et le score UAMS, il n'y a pas de gènes en commun. Cette absence de recoupement entre plusieurs études est un des points qui peuvent faire douter de la fiabilité de ces méthodes. L'absence de recoupement entre deux prédicteurs peut être due à des différences de cohorte, de types de puces (nos puces ne couvraient que 47% du génome), du choix du critère discriminant (l'équipe de Shaughnessy cherchait à prédire les décès précoces) (Shaughnessy et al, 2007). Les deux scores sont indépendants et complémentaires comme en témoigne la figure 28 qui montre que la combinaison des deux scores sur une cohorte indépendante permet d'identifier un sous groupe de patients à très haut risque (patients inclus dans le protocole APEX). L'absence de recouvrement entre différents scores prédictifs a déjà été décrite dans le cancer du sein et ne doit pas être un obstacle à leur développement en clinique.

Cinq scores prédictifs différents, décrits dans le cancer du sein ont été testés sur une cohorte de 295 patientes (Fan et al, 2006). Aucun des modèles n'avait de gène en commun avec les autres. Quatre des scores avaient un pouvoir de prédiction significatif et similaire. Le seul score non pertinent était basé sur l'expression de seulement 2 gènes, ce qui augmente le risque de dépendance vis-à-vis de la cohorte ayant servi à la description du modèle. Les auteurs concluaient que la recherche de gènes communs n'est pas la bonne méthode pour tester la reproductibilité entre deux prédicteurs. Il est préférable d'étudier leur capacité respective à classer des échantillons indépendants. C'est ainsi que le score IFM et UAMS ont tous les deux prouvé leur fiabilité sur plusieurs cohortes de patients. La mise à disposition des données d'expression obtenues sur internet permet de tester rapidement un score prédictif sur différentes cohortes indépendantes.

### **VI.3 Applications en clinique**

Malgré la profusion des biomarqueurs décrits dans de nombreux cancers, très peu de biomarqueurs prédictifs ont réellement un impact sur la prise en charge des patients. Dans le myélome, aucun biomarqueur n'est pris en compte pour définir la stratégie de prise en charge thérapeutique des patients. Pourtant, plusieurs marqueurs biologiques au premier rang desquels la

$\beta 2m$  ont depuis longtemps prouvé leur impact pronostique. A ce jour, la  $\beta 2m$  reste un marqueur pronostique important qui garde un impact indépendant, y compris dans les études de génétiques. Les anomalies cytogénétiques ont également bien prouvé leur impact. Pour autant, aucun de ces critères très performants n'est utilisé pour établir la stratégie thérapeutique des patients atteints de myélome.

Jusqu'à présent, la stratégie thérapeutique dans le myélome ne tient pas compte du pronostic des patients. Cependant, il y a plusieurs années, l'IFM avait mené 3 essais en parallèle (protocoles IFM 99) avec des stratégies différentes en fonction de la présence ou non de deux marqueurs de mauvais pronostic ( $\beta 2m$  et del13). Mais le schéma de l'étude n'était pas fait pour valider cette approche thérapeutique stratifiée sur les biomarqueurs. Plus récemment, l'idée d'une stratégie thérapeutique adaptée au risque a commencé à voir le jour dans deux équipes :

- L'équipe de la Mayo Clinic recommande une prise en charge différente des patients à haut risque et des patients de risque standard selon le score mSMART (basé principalement sur la présence d'anomalies cytogénétiques) (Stewart et al, 2007; Kyle et al, 2009). Deux stratégies thérapeutiques sont proposées chez les patients éligibles pour une intensification thérapeutique mais aussi chez les patients non éligibles. Pour autant, cette proposition ne fait pas l'objet d'un essai randomisé et n'a pas été validée.

- L'équipe de Barlogie propose deux protocoles différents en fonction du risque évalué par le score UAMS. Les patients de bon pronostic sont inclus dans le protocole « total therapy 4 » qui propose de comparer une version allégée de la TT3 avec la version classique. Les patients à haut risque sont inclus dans le protocole « total therapy 5 » avec traitement d'entretien prolongé.

Pour être utilisé en clinique, un test biologique doit répondre à plusieurs impératifs (Lotze et al, 2005; Butterfield et al, 2008) :

- Un test clinique doit être fiable, reproductible et réalisable sur tous les patients.
- Le résultat doit être sans ambiguïté (positif ou négatif), ou sous forme d'un index quantitatif à partir duquel pourront être prises des décisions cliniques.
- Il faut que l'information fournie ait une réelle utilité clinique, qu'elle oriente effectivement des décisions thérapeutiques. Si le résultat n'est pas effectivement utilisé pour choisir le meilleur traitement, le test n'a pas de raison d'être.

- La différence de risques entre les deux populations identifiées doit être cliniquement significative.

### **VI.3.1 Processus de développement d'un biomarqueur prédictif**

La création de nouveaux outils diagnostiques fiables et utiles en clinique à partir des résultats issus des puces à ADN nécessite plusieurs étapes.

- La première étape est la recherche d'un nouveau marqueur moléculaire correspondant à une signature d'expression génique. Les séquences nucléotidiques des puces à ADN, commerciales ou non, doivent être disponibles et annotées avec la dernière version disponible du génome, afin de pouvoir comparer les résultats d'un laboratoire à l'autre. L'étude doit inclure un nombre d'échantillons initial suffisant pour pouvoir réaliser une étude statistique incluant une validation interne. Elle doit conduire à la caractérisation complète du prédicteur, fournir une première estimation de sa précision et de sa valeur ajoutée par rapport aux marqueurs existants.

- La deuxième étape consiste à valider le prédicteur sur des cohortes indépendantes. La valeur prédictive d'un profil d'expression doit être validée par l'analyse d'un grand nombre d'échantillons provenant de patients pour lesquels des données clinico-biologiques sont disponibles (traitements reçus, évolution à long terme,...). Même pour des cancers fréquents comme celui du sein, il n'est pas aisé d'accéder à des séries importantes d'échantillons associées à un suivi précis incluant un traitement homogène, d'autant que les thérapies évoluent, que de nouvelles molécules apparaissent, et que des associations différentes sont proposées... Les études incluent au mieux quelques centaines de tumeurs, ce qui est peu pour découvrir et vérifier la corrélation entre un profil d'expression et une donnée clinique.

- La troisième étape consiste à évaluer le marqueur obtenu en démontrant son utilité dans une étude analogue à un essai clinique de phase III multicentrique.

Ces différentes étapes ont été franchies dans le cancer du sein et deux tests diagnostiques (MammaPrint® et OncoDx®) font l'objet d'études randomisées dont le design est proche d'essais clinique thérapeutiques (Cardoso et al, 2008) (Sparano et al, 2008).

### VI.3.2 Exemple du cancer du sein

Les traitements systémiques (chimiothérapie, hormonothérapie, thérapies moléculaires ciblées) censés éradiquer la maladie métastatique clinique ou infra-clinique, sont délivrés en fonction de facteurs pronostiques et prédictifs. Malheureusement, ceux-ci rendent insuffisamment compte de l'hétérogénéité évolutive de la maladie, conduisant trop souvent à des traitements inadaptés. Les essais cliniques des traitements adjuvants des cancers du sein se sont longtemps limités à des comparaisons globales de populations hétérogènes. Dans les tumeurs localisées sans envahissement ganglionnaire, l'impact favorable de la chimiothérapie sur la survie est démontré. Mais, en raison de l'insuffisance des facteurs pronostiques, la majorité des patientes reçoit une chimiothérapie adjuvante, alors qu'elle ne serait, en réalité, nécessaire que chez 20 % d'entre elles. Il est important d'améliorer la classification pronostique pour affiner les indications thérapeutiques et améliorer la survie.

En 2002, l'équipe de Laura van't Veer a étudié une cohorte de 78 patientes ayant un cancer du sein localisé (van 't Veer et al, 2002), sans envahissement ganglionnaire et identifié une signature de 70 gènes dont l'expression était significativement associée à une évolution clinique péjorative, avec survenue de métastases dans les cinq ans. Cette signature de mauvais pronostic permettait de prédire la survie sans récurrence de façon plus sûre que les critères clinicopathologiques classiques (HR 4,6). Cette signature a été validée rétrospectivement sur une cohorte monocentrique de 295 patientes. Elle a également été validée prospectivement sur une cohorte multicentrique de 302 patientes. Dans cette étude, les analyses étaient effectuées en aveugle. La société Agendia a été créée pour commercialiser ce test pronostique, baptisé MammaPrint qui pourrait être utilisé pour éviter une chimiothérapie chez les patientes ayant un bon pronostic. Ces études ont permis l'acceptation de ce test par la FDA. Ce test est en cours de validation prospective dans un essai baptisé MINDACT (microarray in node-negative disease may avoid chemotherapy trial) et dont l'objectif est de démontrer que la signature permettra de traiter par chimiothérapie moins de patientes qu'avec les critères histologiques et cliniques classiques avec une survie pourtant similaire (Cardoso et al, 2008). L'essai devrait inclure 6 000 patientes. Un test du même type développé par l'Institut Paoli-Calmette de Marseille et l'entreprise française Ipsogen s'adresse aux cancers du sein avec envahissement ganglionnaire et fait actuellement l'objet d'un essai prospectif.

Un autre test (OncoType DX) utilise la technique de RT-PCR mais a suivi les mêmes étapes (Sparano et al, 2008). Chez les femmes ayant un cancer du sein avec expression des récepteurs hormonaux, sans extension ganglionnaire, une grande étude a démontré l'intérêt d'un traitement par Tamoxifène et chimiothérapie. Cependant, compte tenu du faible risque de récurrence après traitement par Tamoxifène (15%, à 10 ans), la majorité de femmes vont être surtraitées. Le test OncoType DX attribue un « score de récurrence » permettant de prédire un risque de récurrence à distance faible, intermédiaire ou élevé pour des patientes recevant un traitement adjuvant par Tamoxifène. Ce score a été validé dans plusieurs cohortes de grande taille. Il a été démontré qu'un score haut identifiait un groupe ayant un taux de rechute à 10 ans de 30,5% et un score faible avec un taux de rechute de 6,8% à 10 ans et que le score était corrélé à la survie. Les patients qui bénéficient du Tamoxifène sont les patients ayant un score bas ou intermédiaire et à l'inverse, le bénéfice de la chimiothérapie a été prouvé chez les patients ayant un risque haut. Ce test prédit la récurrence mieux que les méthodes reconnues (basé sur l'âge, la taille tumeur et le grade...). À la vue des études disponibles, ce test a été commercialisé. Là encore, un large essai prospectif a été débuté récemment pour valider la stratégie thérapeutique basée sur la valeur de ce score et pour définir l'attitude à avoir chez les patientes ayant un score intermédiaire (Sparano et al, 2008).

Pour ces deux tests, la question posée était pertinente cliniquement (limiter les chimiothérapies inutiles) et le nombre de patientes concernées important. Il est important de noter que, dans les deux cas cités, les études sont soutenues par l'industrie.

### **VI.3.3 Biomarqueurs et myélome**

Par rapport au cancer du sein, plusieurs obstacles gênent l'utilisation de biomarqueurs moléculaire en clinique dans le myélome :

- Le cancer du sein est une pathologie beaucoup plus fréquente que le myélome. De ce fait, le nombre d'échantillons disponibles est plus important. Cela permet une validation externe des biomarqueurs proposés beaucoup plus rapide et performante.
- La « culture » du traitement adapté en fonction des caractéristiques de la tumeur est présente depuis plusieurs années dans les cancers solides. Un cancer du sein localisé sans

envahissement ganglionnaire n'est pas pris en charge comme un cancer métastaté. L'étude de l'expression des récepteurs hormonaux permet depuis longtemps de définir l'indication à un traitement hormonal. De ce fait, les médecins prenant en charge les cancers du sein disposent déjà de « gold standard » pouvant servir de référence pour tester l'apport d'un nouveau marqueur. C'est ce qui est fait dans l'essai MINDACT où le test MammaPrint est comparé à une stratégie validée basée sur des critères bio-cliniques. Dans le myélome, la prise en charge est beaucoup plus homogène. Le seul critère vraiment discriminant étant l'éligibilité à l'autogreffe. En dehors de ce critère, tous les patients sont traités de manière homogène en fonction des habitudes des différents pays.

- Dans le cancer du sein, la question clinique est parfaitement posée et l'impact clinique immédiat (éviter des chimiothérapies inutiles aux patientes). Dans le myélome, la question clinique doit être clairement posée. Quel objectif doit-on chercher à atteindre avec l'utilisation de biomarqueurs pronostiques ?

- Il est important de noter que les tests moléculaires dans le cancer du sein sont développés par des industriels avec un investissement financier important mais qui paraît justifié vu le nombre de patientes potentiellement concernées. Là encore, la fréquence plus faible du myélome est un obstacle car l'implication des industriels est moins forte.

Pour développer des biomarqueurs dans le myélome (et notamment des biomarqueurs moléculaires) il faut essayer de surmonter ces différents obstacles.

- Constituer des banques de cellules importantes. Idéalement, tous les patients y compris ceux qui ne sont pas inclus dans des protocoles thérapeutiques devraient avoir des prélèvements médullaires. Ces prélèvements doivent être couplés à des bases de données complètes et fiables permettant de disposer pour tous les patients des données cliniques, biologiques et évolutives. Les essais ayant étudié l'impact de la réponse ont bien illustré les difficultés liées au manque de critères communs d'analyse. Le problème de l'enregistrement fiable du suivi et des données clinico-biologiques associées pour les patients qui ne sont pas inclus dans les protocoles cliniques est un problème majeur. Quelque soit l'importance des données fournies par la génomique, elles n'ont aucune valeur si elles ne sont pas associées aux données des patients.

- La standardisation des techniques de génomique et la mise à disposition des données des patients sur internet est un élément très important qui permet de s'affranchir des difficultés liées au manque d'échantillons disponibles. Cela a permis de valider très rapidement la fiabilité de prédicteurs moléculaires tels que les scores IFM et UAMS.
- Auparavant, seule une fraction des patients pouvaient bénéficier des analyses de génomique, ce qui est un obstacle important à l'utilisation de ces techniques en routine. Les nouveaux protocoles développés par Affymetrix nécessitent moins de matériel génétique (50 à 100 ng d'ADN ou d'ARN) permettant l'analyse de prélèvements moins riches (50 000 cellules seulement sont nécessaires). Ces progrès devraient permettre d'analyser la grande majorité des patients.

Par ailleurs, plusieurs questions importantes doivent être posées avant de débiter la recherche de nouveaux biomarqueurs.

1. **Définir clairement la population étudiée.** Dans le cancer du sein, les différents tests développés ciblaient des sous groupes de patientes. Dans le myélome il faut définir la population ciblée : âge des patients, patients au diagnostic ou en rechute,...
2. **Poser une question clinique pertinente.** C'est un point crucial. Cette question doit être pertinente cliniquement et faire l'objet d'un consensus car elle conditionnera l'identification du prédicteur et la stratégie de validation. Cette question est notamment importante pour définir la future place des scores IFM et UAMS dans la stratégie thérapeutique du myélome. On peut, par exemple, se poser la question d'épargner l'autogreffe aux patients de bon pronostic ou au contraire d'intensifier les traitements de mauvais pronostic avec des traitements d'induction plus intenses et des stratégies de traitement de consolidation et/ou d'entretien.
3. **Définir le critère que l'on cherche à prédire.**

Il est important d'obtenir un consensus sur le critère et sur sa définition. Les études sur l'impact de la qualité de la réponse ont bien montré que l'absence de critères standardisés ne permettait pas de comparaisons correctes entre les études.

*Survie ?*

Les scores IFM et UAMS ont été construits pour prédire la survie. Ils ont été validés dans des cohortes indépendantes dans des contextes très différents : patients au

diagnostic, patients en rechute, patients traités par bortezomib,... Ces scores devraient donc pouvoir être testés en prospectif. Cependant, compte tenu de l'augmentation de la survie des patients, il devient difficile de faire des essais ayant comme critère principal de jugement, la survie.

*Survie sans progression ?*

Compte tenu de l'augmentation de la survie, la PFS devient un critère de jugement majeur dans les essais cliniques. Il paraît donc logique d'essayer de prédire la PFS avec les méthodes de génomique.

*Réponse au traitement ?*

De multiples combinaisons utilisant les nouvelles drogues sont proposées en première ligne ou en rechute avec des taux parfois impressionnants de réponses et de RC. Comment les biomarqueurs peuvent-ils aider à choisir parmi l'ensemble de ces traitements ? Une des pistes serait de développer un prédicteur de la réponse à chacun des traitements pour permettre d'identifier les patients qui seraient susceptibles de bénéficier de tel ou tel traitement. Cependant, il faut alors définir clairement le niveau de réponse que l'on souhaite prédire : réponse quelque soit la qualité de la réponse ?, TBRP et RC ? Absence de réponse ?,... N'est-il pas préférable d'essayer de prédire la rechute précoce ou la progression (résistance au traitement) ?

*Manifestation clinique ?*

A l'instar de ce qui a été fait sur l'atteinte osseuse, on pourrait imaginer de développer des marqueurs prédictifs de complications du myélome ou des traitements. Mais là encore, il faudrait que cette prédiction puisse aboutir à une question clinique.

4. **Etudier la place des marqueurs étudiés par rapport aux anciens marqueurs validés.** Dans toutes les études, d'autres biomarqueurs indépendants sont identifiés en analyse multivariée, notamment le taux de  $\beta 2m$  qui reste un des meilleurs biomarqueurs dans le myélome. Les marqueurs moléculaires ne doivent pas être analysés isolément et il est important de prévoir des sérothèques et plasmathèques pour l'étude simultanée des marqueurs biologiques anciens et nouveaux. Cette étape est primordiale pour permettre une validation rapide des biomarqueurs et leur comparaison avec ceux déjà décrits.

5. Il est important de **définir un « gold standard »** pour servir de test pronostique de référence auquel les futurs marqueurs pourront se comparer.

La démarche ne doit donc pas être passive avec collection du maximum d'échantillons mais une démarche active avec hypothèses, critères de jugement et planification à long terme de ce que l'on souhaite faire. Faute de quoi, les analyses de génomique resteront de beaux outils, objets de publication mais sans aucun impact clinique. La conséquence est que les analyses de génomique doivent être menées dans des laboratoires de transfert qui font le lien entre la clinique et la recherche. C'est l'objectif de la recherche translationnelle qui a pour objectif d'accélérer le processus de transfert des découvertes des scientifiques vers les cliniciens et le patient et vice versa. Les études de recherche translationnelle ont l'intérêt majeur de générer des hypothèses qui peuvent ensuite être validées dans des études cliniques prospectives.

#### **VI.3.4 Recommandations internationales**

Cette difficulté de transfert des biomarqueurs en clinique est générale et plusieurs groupes d'experts ont établi des recommandations pour le développement et la validation des biomarqueurs.

Des recommandations baptisées REMARK (pour Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies) ont été établies et publiées en 2005 simultanément dans plusieurs grandes revues médicales (McShane et al, 2005). Il s'agit de recommandations pour la présentation des résultats de recherche de biomarqueurs. L'objectif est de faciliter l'évaluation de la qualité des études et de permettre une meilleure comparabilité entre les études. Les recommandations suggèrent une liste d'informations importantes qui doivent être fournies concernant le design de l'étude, les hypothèses, les caractéristiques des patients et des échantillons, les méthodes utilisées, les analyses statistiques. Elles souhaitent susciter un effort des cliniciens, statisticiens et biologistes pour que les marqueurs qui paraissent utiles pour la prise en charge des patients puissent être rapidement transférés en clinique. Elles suggèrent que les études prédictives devraient être conduites dans des essais randomisés avec effectif suffisant. Cependant, il n'y a pas de recommandations spécifiques pour les biomarqueurs génomiques.

Il y a également un programme nommé PACCT (Program for the Assessment of Clinical Cancer Tests) qui propose un document contenant les questions qu'il est important de se poser pour savoir si un biomarqueur est prêt pour être transféré en clinique (<http://www.cancerdiagnosis.nci.nih.gov/assessment/>). Une des questions importantes est de définir à quelle question clinique répond le prédicteur (la question sous jacente étant quelle conséquence clinique aura le prédicteur). Par ailleurs, une question concerne l'importance du biomarqueur par rapport aux marqueurs déjà utilisés.

A l'instar de ce qui a été proposé en EBM (Evidence Based Medicine) pour les essais thérapeutiques, des niveaux de recommandations pour les tests pronostiques ont été établis. Cette classification a pour but de faciliter l'utilisation des biomarqueurs en cours de développement dans des études cliniques.

Valider un biomarqueur reste un processus long et complexe, ce qui explique le faible nombre de marqueurs pronostiques utilisés en routine malgré le nombre important de biomarqueurs qui ont été décrits.

## **VI.4 Avenir**

Les puces à ADN ont initialement été utilisées pour des études de génomique transcriptionnelle. L'analyse des profils d'expression est maintenant mature, les protocoles expérimentaux ainsi que les plateformes sont suffisamment standardisés pour que les résultats soient fiables et comparables entre les différents types de puces et les différents laboratoires. Cependant, l'interprétation des profils d'expression génique est complexe car l'expression des gènes est variable dans le temps, dépendante de multiples facteurs. A l'inverse, les altérations de l'ADN sont stables dans le temps. Les techniques d'analyse des variations du nombre de copies d'ADN à l'échelle du génome permettent d'établir de véritable « caryotype moléculaire ». Par ailleurs, des puces à ADN plus récentes permettent d'analyser les modifications post-transcriptionnelles. Ces nouvelles techniques ont déjà été utilisées pour étudier les cancers.

#### **VI.4.1 Analyse des variations du nombre de copies des chromosomes**

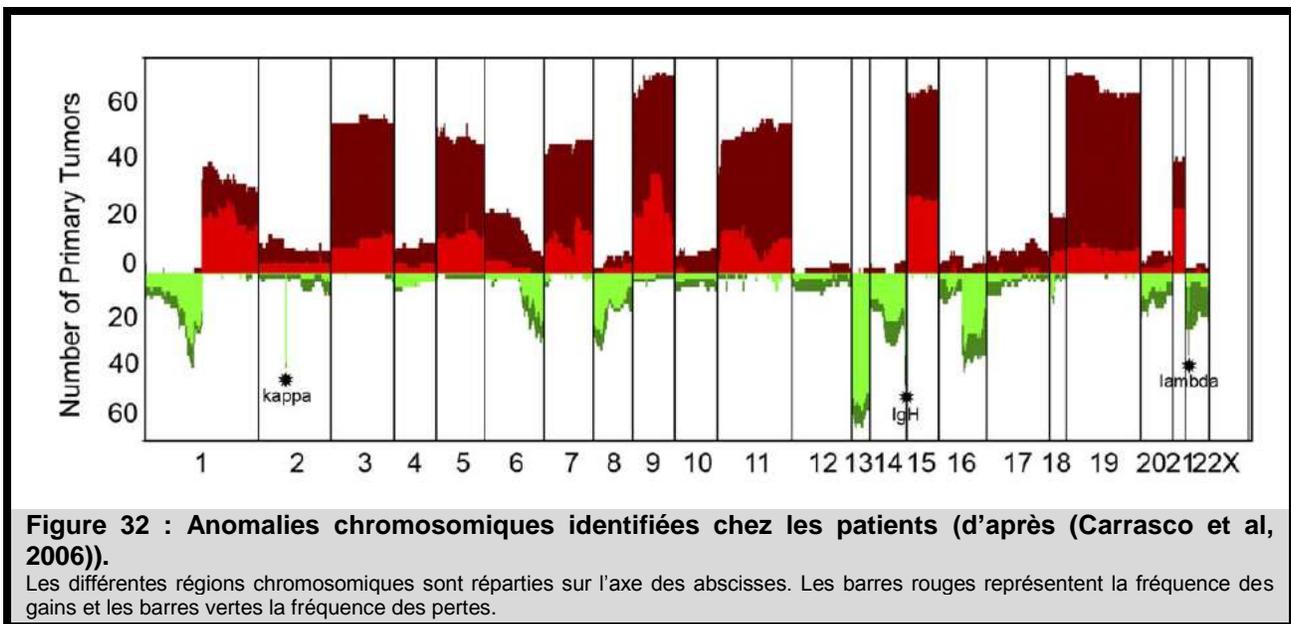
Les altérations du nombre de copies des chromosomes peuvent conduire à l'activation d'un oncogène ou à l'inactivation d'un antioncogène dans les cancers. L'identification des variations du nombre de copies spécifiques d'un cancer peut permettre non seulement d'améliorer les connaissances des mécanismes moléculaires de l'oncogenèse mais également d'identifier des gènes cibles. Les analyses des variations de copies permettent d'identifier des régions délétées ou amplifiées dans le génome. Les premières études menées dans le cancer du sein ont révélé une bonne correspondance entre l'amplification ou la délétion des gènes et leur niveau d'expression (Pollack et al, 2002). L'identification de régions minimales récurrentes de gain–amplification ou perte–délétion dans plusieurs cancers dont l'adénocarcinome du pancréas (Aguirre et al, 2004), le cancer du poumon (Tonon et al, 2005), le myélome multiple (Carrasco et al, 2006), a permis d'établir des profils d'altération du nombre de copies et de classer les patients.

Le caryotype standard a une résolution de 10 à 15 Mb et les caryotypes haute résolution de 3 à 5 Mb (Andrieux 2008). Ces méthodes d'analyse pangénomique ne permettent donc pas d'identifier des remaniements chromosomiques de petites tailles. Elles ont été complétées par des techniques plus résolutive telles que la FISH qui s'est rapidement imposée comme une technique complémentaire du caryotype. Cependant, la FISH n'est pas un examen d'étude globale du génome et ne renseigne que sur les régions chromosomiques étudiées. Récemment, des puces à ADN permettant une approche globale et hautement résolutive du génome ont été développées. Deux approches technologiques coexistent : la première utilise le principe de l'hybridation génomique comparative (CGH) andrieux pinkel pollack barrett, la deuxième est basée sur le génotypage des SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) (Matsuzaki et al, 2004; Gunderson et al, 2005). Les dernières générations de puces commerciales (CGH ou SNP) ont maintenant une résolution effective inférieure à 50 kb. Ces méthodes d'exploration des microremaniements génomiques permettent d'établir de véritable caryotype moléculaire. Par ailleurs, l'intégration des profils d'expression génique et des variations du nombre de copies d'ADN permet l'identification de gènes impliqués dans la physiopathologie de ces tumeurs.

### VI.4.1.1 Hybridation génomique comparative sur puces (puces-CGH)

La CGH consiste à cohybrider la même quantité d'ADN provenant d'un malade et d'un témoin, marquée chacune par un fluorochrome différent, sur les chromosomes d'un sujet normal. Les signaux générés par les deux fluorochromes sont numérisés. Le rapport de l'intensité respective des fluorochromes est établi au niveau des bandes de chacune des paires chromosomiques. Il reflète le rapport de la quantité d'ADN du patient par rapport à celle du témoin. Le principe de la CGH sur puce est le même que celui de la CGH sur chromosomes mais les ADN sont marqués à l'aide de fluorochromes et hybridés, non plus sur des chromosomes, mais sur un support où sont fixés des fragments d'ADN correspondant à des séquences génomiques réparties sur tout le génome (Andrieux 2008). Alors que la résolution des CGH était identique à celle des caryotypes (5-10Mb), la résolution des puces CGH est inférieure à 50 kb.

Carrasco a étudié par puces CGH une cohorte de 67 myélomes au diagnostic et 43 lignées de myélome (Carrasco et al, 2006). Les gains et pertes de chromosomes observés chez les patients étaient comparables à ceux déjà rapportés par d'autres techniques (gains 1q, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21 et délétions 1p et 13). Par ailleurs, des variations du nombre de copies communes aux patients et aux lignées ont été identifiées. Cette étude a confirmé l'hétérogénéité des myélomes hyperdiploïdes en montrant que présence d'une trisomie 11 en l'absence d'une del13 et d'un gain de 1q était associée à un meilleur pronostic.



#### **VI.4.1.2 Génotypage par analyse des SNP (puces SNP)**

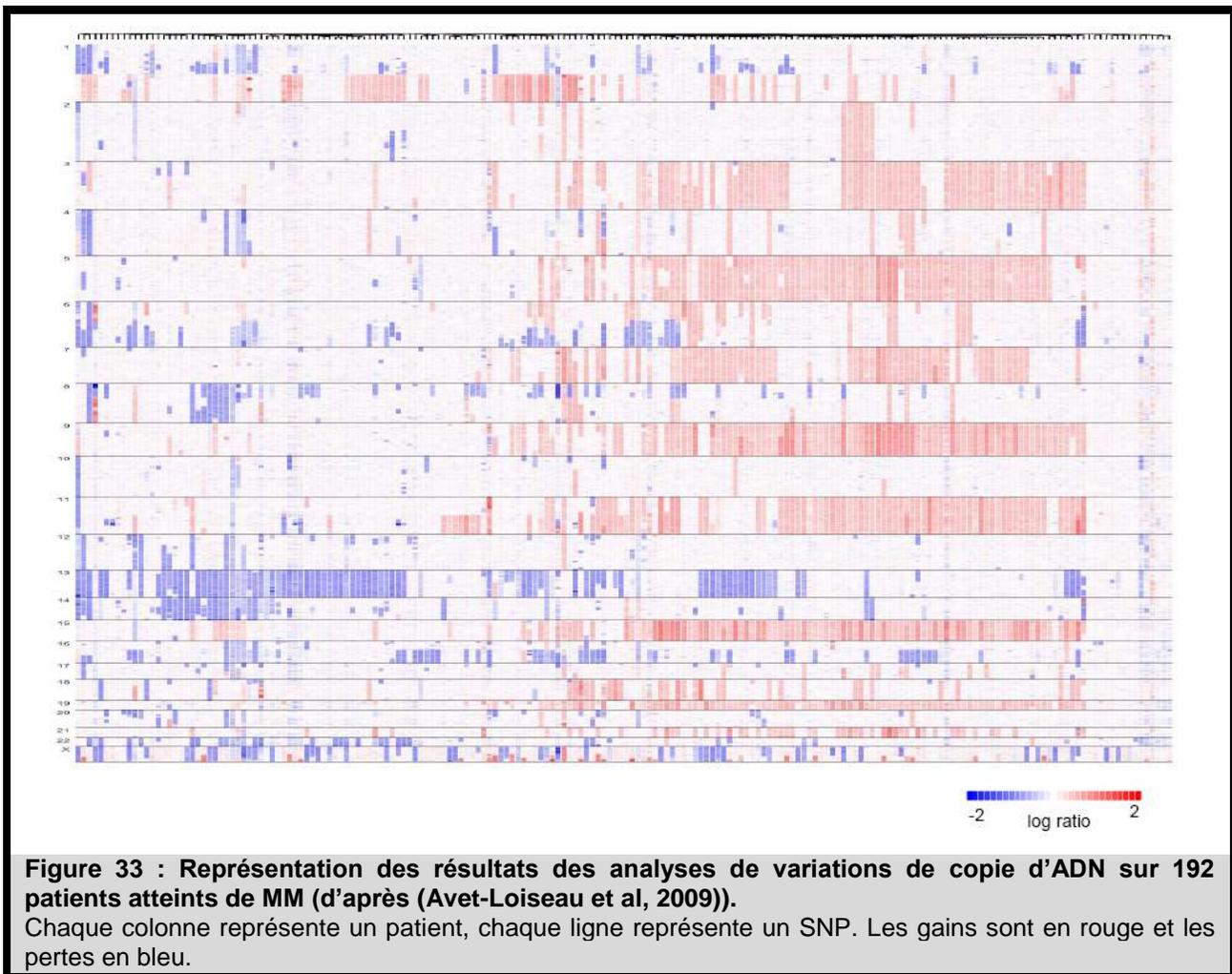
La CGH étant une méthode de quantification de l'ADN d'un patient par rapport à un témoin, elle ne peut pas détecter des anomalies chromosomiques équilibrées. Or ces dernières peuvent également produire des anomalies phénotypiques. C'est le cas notamment dans les cancers, en particulier dans les hémopathies malignes où les anomalies chromosomiques équilibrées, en générant des gènes de fusion, sont une cause majeure du processus de transformation maligne (Rabbitts 1994). Conçus à l'origine pour détecter des polymorphismes génomiques n'impliquant qu'une seule paire de base, l'analyse des SNP peut également être utilisée pour la détection de déséquilibres génomiques avec une résolution de quelques kilobases. Les puces SNP ont plusieurs avantages par rapport aux puces CGH, elles permettent de détecter des anomalies génétiques qui ne changent pas le nombre de copies comme les disomies uniparentales (Teh) et d'obtenir des informations sur les altérations monoalléliques (La Framboise).

Cette approche est maintenant possible pour des études biocliniques en cancérologie (Tonon et al, 2005) car la technologie a considérablement évolué, grâce notamment aux nouvelles générations de puces commerciales du type Gene Chip Human Mapping SNP6 comportant plus de 1.800.000 marqueurs, dont 906.600 SNPs. Les marqueurs non polymorphes (946.000) sont utilisés pour l'analyse des « CNVs », ou Copy Number Variations, permettant la caractérisation des variations du nombre de copies d'ADN, récemment décrites dans le génome humain. Ces nouvelles puces allient une grande précision d'analyse et une très bonne reproductibilité à un coût abordable. L'intérêt de l'analyse des SNP est qu'elle utilise une plateforme Affymetrix commune avec celle permettant l'analyse des profils d'expression génique.

Walker a analysé par puces SNP une cohorte de 30 patients (7 ayant une t(4;14), 12 une t(11;14) et 11 hyperdiploïdes)(Walker et al, 2006). Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes étaient les gains de 1q et 6p et les délétions de 1p, 6q, 8p, 13 et 16q. Les données obtenues par puces SNP étaient comparables à celles obtenues par FISH. Par ailleurs, des disomies uniparentales étaient identifiées chez la majorité des patients (fréquence médiane par patient 3) confirmant que les analyses par puces SNP permettent d'identifier des pertes d'hétérozygotie sans changement du nombre de copie.

Une étude a été menée récemment dans notre équipe sur 192 myélomes de moins de 66 ans au diagnostic et traités par autogreffe (Avet-Loiseau et al, 2009). Les objectifs de cette étude étaient (1) de dresser une carte complète des anomalies chromosomiques chez un grand nombre de patients, (2) d'identifier les régions minimales perdues ou gagnées qui ont un impact sur le pronostic, (3) de déterminer si ces pertes ou gains ont un effet sur l'expression des gènes inclus dans ces régions et (4) de rechercher les régions doublement délétées (nouveaux gènes suppresseurs de tumeur potentielles).

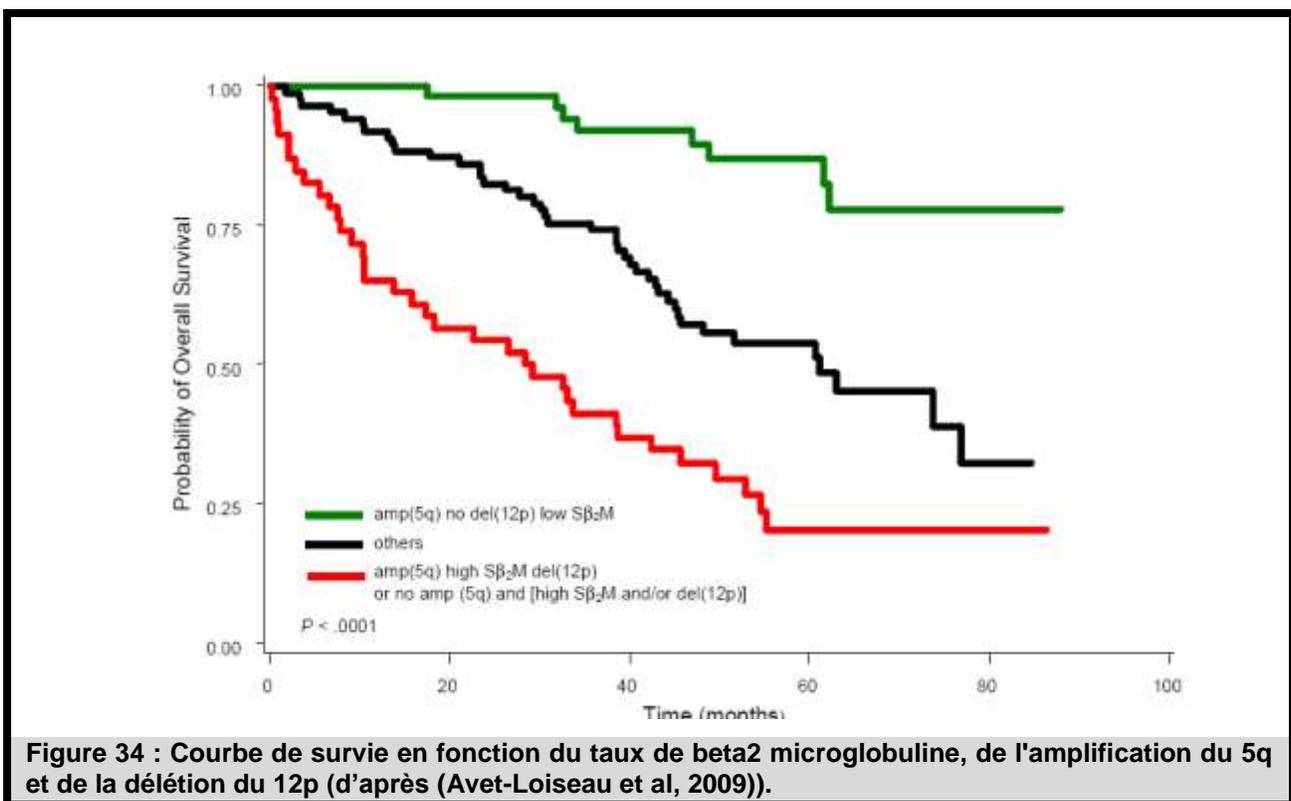
L'analyse en SNP montrait des anomalies chromosomiques chez 98% des patients et permettait de montrer une carte globale des anomalies génétiques dans le myélome.



De nombreuses délétions ou amplifications étaient associées avec la survie. L'analyse multivariée a permis de retenir 3 anomalies significativement associées à la survie :

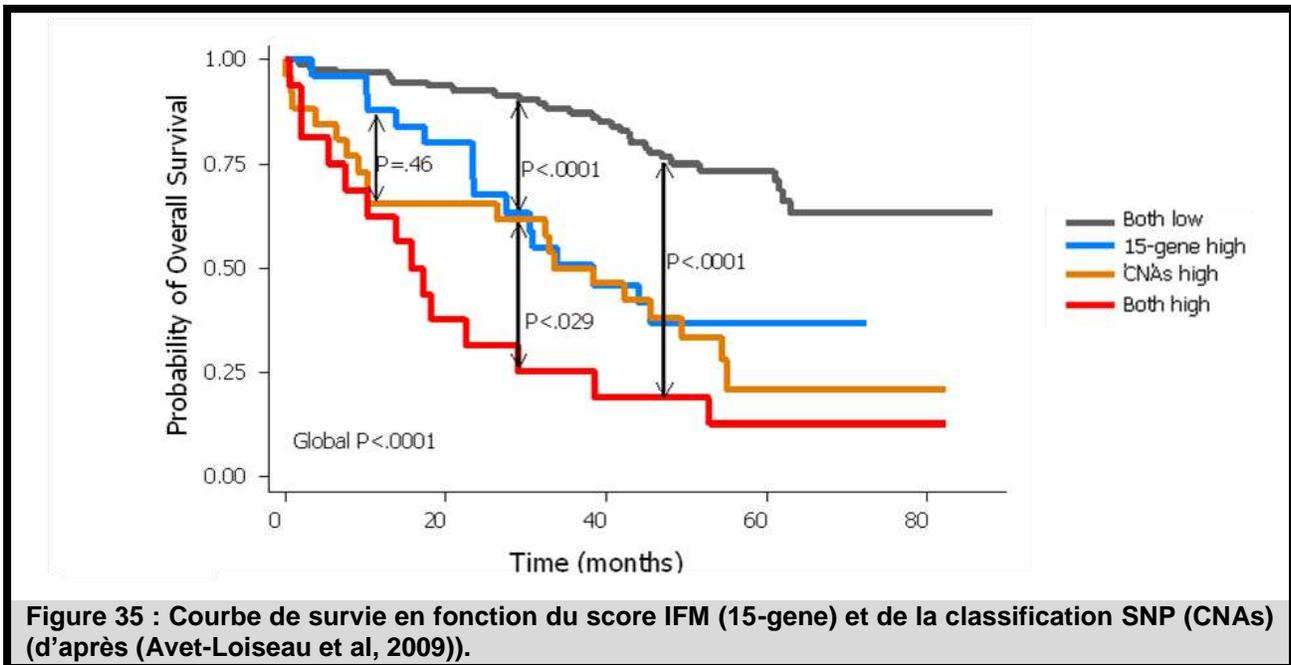
- deux de mauvais pronostic : amplification 1q 23,3 (amp(1q)) et délétion du chromosome 12p13.31 (del(12p))
- une de bon pronostic : amplification 5q3.13 (amp(5q)).

En analyse multivariée tenant compte de la t(4;14), de la del17 et de la  $\beta 2m$ , seuls la del(12p) (HR 3,17 –  $p < 0,0001$ ), l'amp(5q) (HR 0,37 –  $p=0,0005$ ) et le taux de  $\beta 2m$  (HR 2,7 -  $p<0,0001$ ) gardaient un impact pronostique indépendant. Les patients ayant une amp(5q) sans del(12p) et un taux de  $\beta 2m$  bas (29% de la cohorte) avaient un pronostic particulièrement bon avec une survie à 5 ans de 87%. A l'inverse, les patients ayant une amp(5q) associée à une del(12p) et à un taux élevé de  $\beta 2m$  ou les patients n'ayant pas d' amp(5q) mais une del(12p) et/ou un taux élevé de  $\beta 2m$  (25% de la cohorte) avaient un mauvais pronostic avec une survie à 5 ans de 20% (médiane de survie de 28,7 mois - HR 9).



L'impact pronostique de ces deux anomalies chromosomiques et la classification ont été validés par FISH sur une cohorte indépendante de 273 patients indépendants. Dans cette cohorte de validation, 30% des patients étaient classés à haut risque en FISH. Leur survie médiane était de 27,7 mois et leur risque relatif de décès était évalué à 4 par rapport aux patients à faible risque.

Cette classification basée sur les SNP a été comparée au score IFM sur la cohorte de 192 patients. En analyse multivariée, les deux scores étaient des facteurs prédictifs indépendants (score IFM : HR 2,08 et  $p=0,003$ , score SNP : HR 2,77 et  $p<0,0001$ ). La combinaison de ces deux classifications permettait d'identifier un groupe de patients de faible risque avec une survie à 4 ans de 76% et un groupe de haut risque avec une survie à 4 ans de 19%.



Les myélomes hyperdiploïdes ont un meilleur pronostic. Cependant, Chng a démontré que la population des myélomes hyperdiploïdes était très hétérogène (Chng et al, 2007). Dans la cohorte initiale, 99 patients (53%) étaient hyperdiploïdes. L'impact de l'amp(5q) a été étudié chez ces patients. La présence d'une amp(5q) identifiait un groupe de patients ayant un meilleur pronostic ( $p=0,0014$ ). A l'inverse, les patients hyperdiploïdes mais sans amp(5q) avaient une survie identique aux patients non hyperdiploïdes. Ces résultats indiquent que l'hyperdiploïdie avec amp(5q) est une entité associée à un bon pronostic.

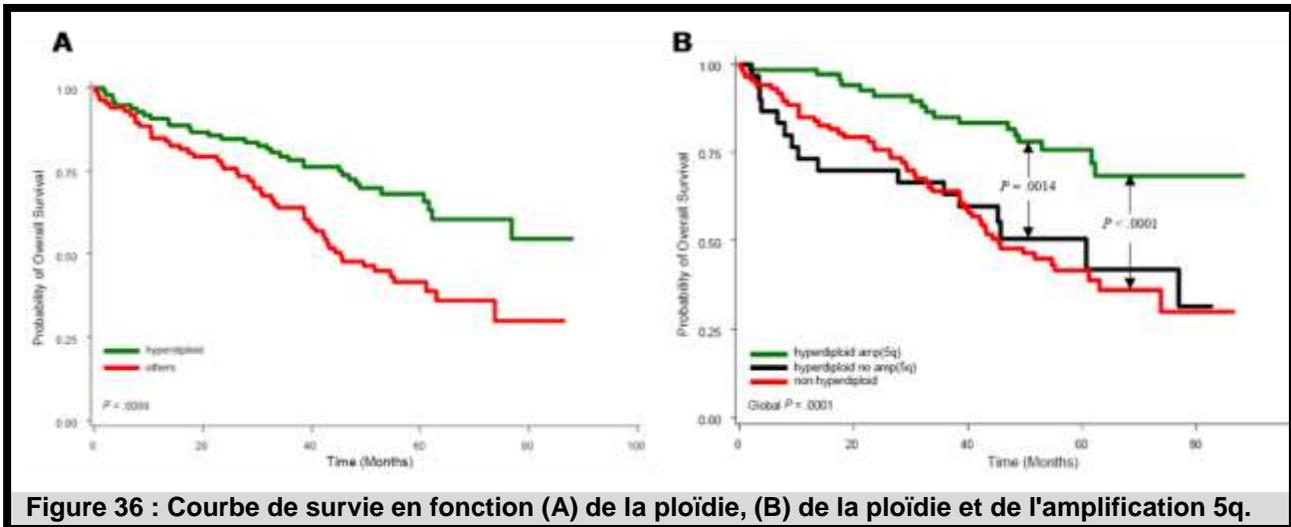


Figure 36 : Courbe de survie en fonction (A) de la ploïdie, (B) de la ploïdie et de l'amplification 5q.

#### VI.4.1.3 Genomique intégrée

La génomique intégrée consiste à combiner une approche de génotypage CGH ou SNP avec l'analyse des profils d'expression génique afin de déterminer l'impact des amplifications ou des délétions géniques sur le transcriptome. Ce type d'approche a été utilisé par plusieurs auteurs dans le myélome.

Carrasco a combiné l'analyse par puces CGH avec l'étude des profils d'expression génique (Carrasco et al, 2006). Il a ainsi identifié des gènes localisés dans des régions chromosomiques fréquemment altérées chez les patients et les lignées. Certains de ces gènes sont connus comme ayant un rôle physiopathologique dans le myélome (c-myc, Mcl1, IL6R,...), d'autres sont de potentiels gènes d'intérêt. Dans son étude, Walker a sélectionné les 117 régions ayant une perte d'hétérozygotie présente chez plus de 10% des patients (Walker et al, 2006). L'analyse des profils d'expression génique a permis d'identifier 3 041 gènes localisés dans ces régions chromosomiques. Pour limiter le nombre de gènes d'intérêt, il a comparé cette liste de gènes avec la liste des gènes discriminants entre plasmocytes de sujets sains, de MGUS et de myélome (Davies et al, 2003). Il a ainsi retenu 47 gènes d'intérêt.

La délétion du chromosome 16q a un impact pronostique indépendant de la t(4;14) et de la del17. Pour essayer d'identifier les gènes impliqués par cette anomalie chromosomique, Jenner a étudié 55 patients en combinant puces SNP et analyse des profils d'expression génique (Jenner et al,

2007). Une délétion 16q a été mise en évidence chez 22 patients (40%). La comparaison des profils d'expression génique des patients avec et sans délétion 16q a permis d'identifier plusieurs gènes potentiellement impliqués par cette délétion. Deux de ces gènes CYLD et WWOX semblent particulièrement intéressants. CYLD est un régulateur négatif de NF-KB et WWOX est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans l'apoptose.

Notre équipe a également combiné l'analyse des SNP avec celles des profils d'expression génique (Avet-Loiseau et al, 2009). En ciblant les zones ayant un impact pronostic, la combinaison des analyses en SNP et des profils d'expression génique a permis d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans le mauvais pronostic des patients. Cinq gènes étaient significativement associés au pronostic : 4 surexprimés et situés sur le chromosome 1q23.3 (ILF2, ADAR, ALDH9A1, UBAP2L) et un gène sous exprimé situé sur le chromosome 12p13.31 (CD27). Ainsi, la combinaison des analyses de SNP et de profils d'expression génique a permis d'identifier des gènes potentiellement importants. L'un deux (CD27) a déjà été décrit comme associé à l'oncogenèse du myélome et à la progression de la maladie. Les autres ne sont pas connus comme liés à la physiopathologie du myélome.

## **VI.4.2 Modifications post transcriptionnelles**

Les techniques d'analyse des profils d'expression étudiaient l'expression des gènes sans tenir compte des modifications post-transcriptionnelles. Plusieurs études ont démontré l'impact de l'épissage alternatif et des micro-ARN sur la traduction et l'expression des protéines. Des puces à ADN permettent, maintenant, de les étudier.

### ***VI.4.2.1 Epissage alternatif***

L'épissage est le procédé moléculaire par lequel les introns d'un ARN pré-messager (pré-ARNm) sont enlevés de façon à former un ARN messager (ARNm) qui sera transporté au cytoplasme pour y être traduit en protéine. L'épissage alternatif implique une maturation différentielle du pré-ARNm. Selon le nombre total d'événements d'épissage alternatif se produisant sur un pré-ARNm, plusieurs ARNm différents (de deux à plusieurs centaines) pourront être produits, chacun de ces ARNm pouvant potentiellement mener à une protéine différente. L'épissage alternatif fait partie du programme normal d'expression de la majorité des gènes humains et peut mener à la

production de protéines très différentes. Plusieurs études ont noté l'existence de différences dans les profils d'épissage alternatif entre tissus normaux et cancéreux (Wang et al, 2003; Pajares et al, 2007; Venables et al, 2008). Les cellules cancéreuses présentent des dérèglements de l'épissage alternatif affectant des gènes associés à la prolifération cellulaire, à la progression tumorale et à la résistance à l'apoptose. Certaines de ces perturbations sont causées par des mutations aux sites d'épissage et leurs éléments de contrôle, tandis que d'autres sont provoquées par des changements dans l'expression des protéines contrôlant la sélection des sites d'épissage. Dans le MM, Adamia (Adamia et al, 2005) a démontré que le gène de la hyaluronan synthase 1 (HAS1) subit un épissage aberrant. Les auteurs ont identifié 3 nouveaux variants d'épissage de HAS1 (HAS1Va, HAS1Vb, et HAS1Vc), détectés chez des patients atteints de MM ou de MGUS. L'expression de la variante d'épissage HAS1Vb était significativement corrélée à une survie réduite ( $p=0.001$ ).

La première génération de puces d'expression contenait des sets d'oligonucléotides (ou des fragments d'ADN complémentaires) dirigés préférentiellement contre l'extrémité 3' des gènes. Affymetrix propose aujourd'hui des puces « Exon » permettant l'analyse transcriptionnelle non seulement au niveau des gènes mais aussi au niveau des exons. Ces puces contiennent des sets d'oligonucléotides permettant d'interroger plus d'un million d'exons (sur l'ensemble du génome) dans les régions transcrites connues ou prédites. Ces outils permettent, schématiquement de quantifier l'expression des ARN messagers au niveau des exons. Ils offrent ainsi la possibilité d'une analyse complète de l'épissage alternatif de l'ARN sur l'ensemble du génome humain et l'identification des variants d'épissage connus, ainsi que la détection des variants non encore découverts ou répertoriés. Ce type d'analyse devrait permettre d'analyser les mécanismes moléculaires régulés par l'épissage alternatif, de découvrir de nouveaux transcrits alternatifs ou bien encore de mettre en évidence des schémas d'épissage associés à une maladie ou à un phénotype particulier.

Une première étude utilisant des puces de ce type a été publiée dans le cancer du sein (Andre et al, 2009). Les auteurs ont étudié une cohorte de 120 cancers du sein et 45 tumeurs bénignes du sein et démontré que les exons s'exprimaient différemment dans les lésions malignes et bénignes, et que les variants d'épissage alternatif identifiés étaient spécifiques des tumeurs malignes du sein. Dans le myélome, ces analyses sont également prometteuses. Notre équipe a rapporté au

dernier congrès de l'ASH une étude menée chez 170 patients traités par double autogreffe dans le cadre d'un protocole IFM (Munshi et al, 2008). Les auteurs ont identifiés 52 exons dont l'expression était corrélée à la réponse au traitement et 85 dont l'expression était corrélée à la survie. Cette étude préliminaire démontre l'intérêt potentiel de l'analyse de l'épissage alternatif.

#### **VI.4.2.2 Micro-ARN**

Les micro-ARN (miRNA) sont des ARN simple-brin longs d'environ 21 à 24 nucléotides. Les miRNA sont des répresseurs post-transcriptionnels. En s'appariant à des ARN messagers, ils guident leur dégradation, ou la répression de leur traduction en protéine. Il existe plusieurs centaines de gènes de miRNA dans les génomes de la plupart des organismes pluricellulaires (Ventura et al, 2009). Les miRNA ont été montrés comme étant impliqués dans un grand nombre de fonctions physiologiques essentielles telles la croissance cellulaire, l'apoptose, le métabolisme,... Depuis quelques années, les miRNA ont été décrits comme dérégulés dans un grand nombre de tumeurs (Tsai et al, 2008; Chen et al, 2009; Faber et al, 2009). Il existe plusieurs mécanismes potentiels par lesquels les miRNA pourraient avoir un rôle dans l'oncogénèse. La surexpression d'un miRNA qui réprime un suppresseur de tumeur pourrait inhiber l'activité de l'anti-oncogène (miRNA équivalent d'un oncogène). A l'inverse, la diminution d'expression d'un miRNA qui normalement réprime un oncogène pourrait entraîner une augmentation de l'expression de l'oncogène (miRNA équivalent d'un anti-oncogène). Un exemple du rôle des miRNA dans le myélome est fourni par une étude de Löffler (Loffler et al, 2007). Les auteurs ont démontré que l'IL6 induit la transcription de miR-21 via Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3). Le gène codant pour miR-21 contient deux sites de liaison à Stat3 dans sa région régulatrice. Stat3 est un médiateur majeur de l'IL6, nécessaire à la croissance et à la survie médiée par l'IL6 des lignées de myélome. L'expression ectopique de miR-21 en l'absence d'IL6 diminuait l'apoptose des lignées prouvant le rôle protecteur de miR-21. Le rôle protecteur de l'apoptose de certaines molécules n'est donc pas seulement liée à la régulation de protéines pro ou anti apoptotique mais également à la régulation de l'expression de miRNA.

Des puces à ADN permettant d'étudier l'expression des miRNA sont maintenant disponibles. Picchiori a utilisé ce type de puces pour analyser les plasmocytes de 49 lignées de myélome, 16

myélomes, 6 MGUS et 6 donneurs sains (Pichiorri et al, 2008). Il a mis en évidence une signature de miRNA associée au myélome. Cette signature inclut des miRNA qui répriment l'expression de protéines impliquées dans la physiologie du myélome (par exemple SOCS-1, protéine fréquemment sous exprimée dans le MM et qui a un rôle inhibiteur de la croissance induite par l'IL6).

L'amélioration des techniques de génomique permet d'analyser de plus en plus finement les anomalies du génome. Pour autant, il est difficile de prédire l'élément qui sera le plus pertinent cliniquement. Avec ces progrès, quel sera l'avenir des profils d'expression génique ? Les données obtenues récemment dans notre unité ont démontré que les profils d'expression génique et les analyses de variations du nombre de copies de gènes n'apportent pas les mêmes informations. La combinaison des deux approches permet d'identifier un groupe de très mauvais pronostic et un groupe de très bon pronostic. Par ailleurs, sur un versant plus scientifique, l'analyse des profils d'expression génique ciblée sur les régions amplifiées ou délétées d'intérêt permet de découvrir des gènes associés au pronostic dans le myélome.

#### **VI.4.3 Prédiction de complications ou d'effets secondaires des traitements.**

Les études de génomique pourront être utilisées pour essayer de prédire le risque individuel d'effets secondaires d'une drogue. Ces études pourront être basées sur l'analyse génétique des cellules tumorales ou de cellules normales (ADN constitutionnel). La prescription de bortezomib est compliquée par la survenue relativement fréquente (~ 30% des patients) de neuropathies périphériques, douloureuses et invalidantes. L'apparition de ces neuropathies est totalement imprévisible, et ne semble pas liée à la dose de médicament administrée. Ainsi, certains patients développent une neuropathie symptomatique très précocement (parfois dès le second cycle), alors que d'autres patients peuvent recevoir plus de 10 cycles sans aucune manifestation clinique. Ces modalités de survenue suggèrent l'existence d'une susceptibilité individuelle variable au bortezomib. Notre unité va mener une étude pour rechercher des marqueurs génétiques constitutionnels associés à la survenue d'une neuropathie au bortezomib. Le but de ce projet de recherche translationnelle est d'identifier les caractéristiques génétiques constitutionnelles liées à la survenue de ces neuropathies précoces. Pour atteindre cet objectif, en partant des données cliniques, nous analyserons les différences observées à partir de l'étude de plusieurs centaines de

milliers de polymorphismes génétiques entre une population de patients ayant présenté une neuropathie précoce, et une population de patients ayant reçu au moins 4 cycles de Velcade et n'ayant pas développé de neuropathie clinique. Les populations étudiées proviendront des essais de l'IFM. Dans le cadre de ces essais, des prélèvements biologiques sont systématiquement adressés au Laboratoire d'Hématologie du CHU de Nantes. L'analyse comparée des 2 populations de patients permettra d'identifier les polymorphismes liés à la susceptibilité neurotoxique au bortezomib. Ce type d'étude, couplé à des études de prédiction de la réponse au traitement devrait permettre une réelle individualisation du traitement en fonction de la balance bénéfices/risques.

#### **VI.4.4 Prédiction du risque de transformation maligne des MGUS et des SMM**

Le risque d'évolution des MGUS et des SMM vers un MM est estimé respectivement à 1% et 10% par an (Kyle et al, 2002; Kyle et al, 2007). Par ailleurs, deux études récentes ont démontré que 90 à 100% des MM sont précédés par une MGUS (Landgren et al, 2009; Weiss et al, 2009). L'identification des patients ayant un risque très élevé d'évolution vers un MM permettrait d'adapter le suivi au risque individuel et de proposer des stratégies thérapeutiques préventives aux patients les plus à risque. Des études de cohorte ont identifié des facteurs prédictifs de l'évolution des MGUS et des SMM : isotype, taux de composant monoclonal, dosage des chaînes légères libres sériques, plasmocytose médullaire, pourcentage de plasmocytes médullaires anormaux en cytométrie,... Des scores combinant plusieurs de ces facteurs ont été proposés et permettent de définir des groupes de patients ayant des risques évolutifs différents (Rajkumar et al, 2005).

Dans le MM, les analyses génétiques ont apporté des données nouvelles offrant la possibilité de prédire l'évolution des patients de manière plus performante et précise que les données biologiques habituelles. Les études récentes et en cours menées dans plusieurs laboratoires dont le nôtre démontrent la contribution majeure des marqueurs moléculaires issus de la FISH (hybridation en interphase), des profils d'expression génique et des analyses des variations du nombre de copies d'ADN dans des modèles pronostiques multivariés. Nous pensons que ces approches sont aussi parfaitement adaptées pour contribuer à améliorer les modèles prédictifs d'évolution des MGUS/SMM vers un MM.

Les études de FISH ont montré que MGUS, SMM et MM partageaient des anomalies chromosomiques communes (Avet-Loiseau et al, 1999). Cependant, aucun lien n'a été établi entre la présence de ces anomalies et le pronostic des MGUS et SMM. Des études de génomique à grande échelle appliquées aux MGUS et SMM pourraient permettre :

1. d'identifier des anomalies potentiellement associées au risque évolutif.
2. d'améliorer la prédiction du risque évolutif en associant les données moléculaires aux données biologiques, phénotypiques et à un suivi à long terme.
3. de décrire les anomalies de variation du nombre de copies et de profils d'expression présentes dès les stades précoces du MM. Ces données pourraient permettre d'identifier des gènes impliqués dans l'oncogenèse du MM et de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous allons débiter prochainement une étude prospective (nommée GENOMGUS) dont l'objectif est de définir un modèle prédictif de transformation maligne précoce (dans les 5 ans) des MGUS et SMM basé sur des marqueurs biologiques et moléculaires (profils d'expression et SNP). L'effectif prévu est de 1 000 MGUS et de 200 SMM. Cette étude devrait nous permettre d'identifier un sous groupe de patients à très haut risque évolutif et de proposer des stratégies préventives de la transformation maligne.

## VII. Conclusion

De nombreux biomarqueurs et notamment génétiques sont maintenant accessibles dans le myélome. Cependant, pour le moment, ils n'ont pas d'impact clinique. Les études de génomique et notamment de profils d'expression génique ont maintenant bien démontré leur intérêt dans le myélome. Le développement récent par plusieurs équipes, dont la nôtre, de scores prédictifs basés sur l'expression d'un nombre limité de gènes ouvre des perspectives d'utilisation de ces techniques dans la prise en charge quotidienne des patients. Ces scores ont été validés sur des cohortes externes et indépendantes de patients et ont démontré leur fiabilité. La standardisation des techniques de génomique, le développement des plateformes commerciales, font que les obstacles techniques qui freinaient le développement de ces techniques ne sont plus importants. Le principal problème est maintenant le transfert de ces données de plus en plus nombreuses en clinique.

Cet objectif est mis en avant dans le rapport du Pr Grunfeld préliminaire au futur Plan cancer ([http://www.e-cancer.fr/v1/fichiers/public/rapport\\_grunfeld\\_104pages\\_srm\\_mars\\_2009\\_v3.pdf](http://www.e-cancer.fr/v1/fichiers/public/rapport_grunfeld_104pages_srm_mars_2009_v3.pdf)) :

### Extraits du rapport Grunfeld

#### « Accélérer l'impact des découvertes pour le patient : la recherche translationnelle

Un des buts du prochain Plan Cancer pourrait être, au delà de la recherche libre et «non dirigée», de désigner des objectifs spécifiques, à court et moyen termes, destinés à des applications pour les patients ou l'ensemble de la société. Cette recherche appliquée ou «translationnelle» articule la recherche finalisée en cancérologie avec le tissu de la recherche fondamentale afin de limiter le temps séparant la découverte en laboratoire de son application pour le malade. Elle permet aussi de questionner la recherche fondamentale sur des observations cliniques ou épidémiologiques et aboutir à une meilleure compréhension des cancers et de leurs traitements. » Ces dernières années, la modernisation des techniques principalement en biologie cellulaire et moléculaire, en génétique et en imagerie a permis de faire des progrès majeurs qui se traduisent en outils de prévention, de diagnostic et de traitement des cancers. Le champ de cette recherche translationnelle porte actuellement sur six grands domaines d'investigation:

- les nouveaux agents thérapeutiques qui nécessitent l'identification des nouvelles cibles ;

- les biomarqueurs indispensables à la prévention, au diagnostic précoce et à l'évaluation de l'efficacité thérapeutique ;
- l'imagerie associée à la fois aux biomarqueurs et aux agents thérapeutiques ;
- les modifications de la réponse immunologique contre les tumeurs ;
- les technologies interventionnelles ;
- et la relation entre les comportements, les individus et les cancers.

Ces différents domaines d'investigation nécessitent une rationalisation dans leur exploration et leur évaluation stricte afin d'une part de pouvoir explorer des pistes variées, d'autre part de ne pas sous-estimer ou surestimer l'impact des actions menées. »

**« Mesure : Développer une politique de sites dans lesquels sont présents des chercheurs en sciences fondamentales, des cliniciens, des ingénieurs, avec une masse critique suffisante dédiée à ces approches translationnelles. »**

**« Mesure : Mettre en place des critères stricts de qualité des tumorothèques de recherche :** informations sur le suivi clinique, qualité des échantillons, et mise à la disposition de la communauté de la recherche des échantillons tumoraux pour développer la recherche translationnelle. »

Les analyses de génomique sont maintenant quasiment systématiquement couplées aux essais cliniques. La collaboration étroite entre notre unité et l'IFM, le dynamisme de l'IFM avec de nombreux protocoles tant chez les sujets âgés que chez les sujets jeunes, permet de disposer de nombreux échantillons de plasmocytes purifiés couplés à des données évolutives complètes et fiables. Cela devrait nous permettre de valider le score IFM dans différentes situations, de définir les situations cliniques d'utilisation optimale. Il restera à définir une stratégie thérapeutique basée sur les résultats des analyses des profils d'expression génique.

Cependant, les progrès de la génomique, notamment de l'analyse des variations de nombre de copies peuvent remettre en cause l'intérêt clinique des profils d'expression génique en mettant en évidence des marqueurs pronostiques encore plus performants. Dans cette évolution très rapide des connaissances, la difficulté est de réussir à concilier deux attitudes qui peuvent paraître contradictoires :

- prendre le temps de « s'arrêter » et de valider les biomarqueurs décrits pour permettre leur utilisation en clinique. Le risque de cette attitude est de se focaliser sur un biomarqueurs finalement peu pertinent.

- poursuivre la quête du « biomarqueur idéal » en multipliant les études. Le risque de cette attitude est de décrire de très nombreux prédicteurs pertinents mais de ne pas pouvoir les transférer vers la clinique.

Entre ces deux attitudes extrêmes, il est important de trouver un juste milieu permettant la poursuite de l'amélioration des connaissances tout en améliorant la prise en charge des patients au quotidien.

## VIII. Références bibliographiques

- Abraham, R.T. and Gibbons, J.J. (2007). The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 13, 3109-14.
- Adamia, S., Reiman, T., Crainie, M., Mant, M.J., Belch, A.R. and Pilarski, L.M. (2005). Intronic splicing of hyaluronan synthase 1 (HAS1): a biologically relevant indicator of poor outcome in multiple myeloma. *Blood.* 105, 4836-44.
- Aguirre, A.J., Brennan, C., Bailey, G., Sinha, R., Feng, B., Leo, C., et al. (2004). High-resolution characterization of the pancreatic adenocarcinoma genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 9067-72.
- Alexanian, R., Haut, A., Khan, A.U., Lane, M., McKelvey, E.M., Migliore, P.J., et al. (1969). Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *Jama.* 208, 1680-5.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., et al. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 403, 503-11.
- Anderson, K.C., Jones, R.M., Morimoto, C., Leavitt, P. and Barut, B.A. (1989). Response patterns of purified myeloma cells to hematopoietic growth factors. *Blood.* 73, 1915-24.
- Andre, F., Michiels, S., Dessen, P., Scott, V., Suci, V., Uzan, C., et al. (2009). Exonic expression profiling of breast cancer and benign lesions: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 10, 381-90.
- Andrieux, J. (2008). Puces à ADN (CGH-array): application pour le diagnostic de déséquilibres cytogénétiques cryptiques. *Pathol Biol (Paris).* 56, 368-74.
- Attal, M., Harousseau, J.L., Facon, T., Guilhot, F., Doyen, C., Fuzibet, J.G., et al. (2003). Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 349, 2495-502.
- Attal, M., Harousseau, J.L., Stoppa, A.M., Sotto, J.J., Fuzibet, J.G., Rossi, J.F., et al. (1996). A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myelome. *N Engl J Med.* 335, 91-7.
- Avet-Loiseau, H. (2007). Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 20, 625-35.
- Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., Hulin, C., et al. (2007). Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood.* 109, 3489-95.
- Avet-Loiseau, H., Cheng, L., Magrangeas, F., Gouraud, W., Charbonnel, C., Harousseau, J.L., et al. (2009). Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol.* sous presse.
- Avet-Loiseau, H., Facon, T., Daviet, A., Godon, C., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., et al. (1999). 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. *Cancer Res.* 59, 4546-50.
- Avet-Loiseau, H., Facon, T., Grosbois, B., Magrangeas, F., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., et al. (2002). Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood.* 99, 2185-91.

- Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J.L. and Bataille, R. (2001). Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*. 98, 3082-6.
- Avet-Loiseau, H., Li, J.Y., Facon, T., Brigaudeau, C., Morineau, N., Maloisel, F., et al. (1998). High incidence of translocations t(11;14)(q13;q32) and t(4;14)(p16;q32) in patients with plasma cell malignancies. *Cancer Res*. 58, 5640-5.
- Avet-Loiseau, H., Li, J.Y., Godon, C., Morineau, N., Daviet, A., Harousseau, J.L., et al. (1999). P53 deletion is not a frequent event in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 106, 717-9.
- Avet-Loiseau, H., Li, J.Y., Morineau, N., Facon, T., Brigaudeau, C., Harousseau, J.L., et al. (1999). Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myelome*. *Blood*. 94, 2583-9.
- Avet-Loiseau, H., Minvielle, S., Mellerin, M.P., Magrangeas, F. and Bataille, R. (2000). 14q32 chromosomal translocations: a hallmark of plasma cell dyscrasias? *Hematol J*. 1, 292-4.
- Avet-Loiseau, H., Daviet, A., Sauner, S. and Bataille, R. (2000). Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Br J Haematol*. 111, 1116-7.
- Barlogie, B., Alexanian, R., Dicke, K.A., Zagars, G., Spitzer, G., Jagannath, S., et al. (1987). High-dose chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation for resistant multiple myeloma. *Blood*. 70, 869-72.
- Barlogie, B., Alexanian, R., Smallwood, L., Cheson, B., Dixon, D., Dicke, K., et al. (1988). Prognostic factors with high-dose melphalan for refractory multiple myeloma. *Blood*. 72, 2015-9.
- Barlogie, B., Desikan, R., Eddlemon, P., Spencer, T., Zeldis, J., Munshi, N., et al. (2001). Extended survival in advanced and refractory multiple myeloma after single-agent thalidomide: identification of prognostic factors in a phase 2 study of 169 patients. *Blood*. 98, 492-4.
- Barlogie, B., Hall, R., Zander, A., Dicke, K. and Alexanian, R. (1986). High-dose melphalan with autologous bone marrow transplantation for multiple myeloma. *Blood*. 67, 1298-301.
- Barlogie, B., Smith, L. and Alexanian, R. (1984). Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N Engl J Med*. 310, 1353-6.
- Baron, D., Raharjaona, M. and Houlgatte, R. (2007). Puces à ADN. *IRBM*. 28, 210-5.
- Bataille, R., Boccadoro, M., Klein, B., Durie, B. and Pileri, A. (1992). C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. *Blood*. 80, 733-7.
- Bataille, R., Durie, B.G. and Grenier, J. (1983). Serum beta2 microglobulin and survival duration in multiple myeloma: a simple reliable marker for staging. *Br J Haematol*. 55, 439-47.
- Bataille, R., Durie, B.G., Grenier, J. and Sany, J. (1986). Prognostic factors and staging in multiple myeloma: a reappraisal. *J Clin Oncol*. 4, 80-7.
- Bataille, R., Grenier, J. and Sany, J. (1984). Beta-2-microglobulin in myeloma: optimal use for staging, prognosis, and treatment--a prospective study of 160 patients. *Blood*. 63, 468-76.
- Bataille, R., Robillard, N., Pellat-Deceunynck, C. and Amiot, M. (2003). A cellular model for myeloma cell growth and maturation based on an intracлонаl CD45 hierarchy. *Immunol Rev*. 194, 105-11.

- Benjamin, M., Reddy, S. and Brawley, O.W. (2003). Myeloma and race: a review of the literature. *Cancer Metastasis Rev.* 22, 87-93.
- Bergsagel, P.L. and Kuehl, W.M. (2005). Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 23, 6333-8.
- Bertucci, F., Bernard, K., Llorion, B., Chang, Y.C., Granjeaud, S., Birnbaum, D., et al. (1999). Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum Mol Genet.* 8, 1715-22.
- Bertucci, F., Llorion, B., Tagett, R., Granjeaud, S., Birnbaum, D., Nguyen, C., et al. (2001). Puces à ADN: technologie et applications. *Bull Cancer.* 88, 243-52.
- Blade, J. (2006). Clinical practice. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 355, 2765-70.
- Blade, J., Lopez-Guillermo, A., Bosch, F., Cervantes, F., Reverter, J.C., Montserrat, E., et al. (1994). Impact of response to treatment on survival in multiple myeloma: results in a series of 243 patients. *Br J Haematol.* 88, 117-21.
- Brenner, H., Gondos, A. and Pulte, D. (2008). Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma. *Blood.* 111, 2521-6.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J.H., Hafen, E., et al. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 18, 2893-904.
- Butterfield, L.H., Disis, M.L., Fox, B.A., Lee, P.P., Khleif, S.N., Thurin, M., et al. (2008). A systematic approach to biomarker discovery; preamble to "the iSBTc-FDA taskforce on immunotherapy biomarkers". *J Transl Med.* 6, 81.
- Cardoso, F., Van't Veer, L., Rutgers, E., Loi, S., Mook, S. and Piccart-Gebhart, M.J. (2008). Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial. *J Clin Oncol.* 26, 729-35.
- Carrasco, D.R., Tonon, G., Huang, Y., Zhang, Y., Sinha, R., Feng, B., et al. (2006). High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell.* 9, 313-25.
- Cartwright, R.A., Gurney, K.A. and Moorman, A.V. (2002). Sex ratios and the risks of haematological malignancies. *Br J Haematol.* 118, 1071-7.
- Chauhan, D., Auclair, D., Robinson, E.K., Hideshima, T., Li, G., Podar, K., et al. (2002). Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene.* 21, 1346-58.
- Chen, H.C., Chen, G.H., Chen, Y.H., Liao, W.L., Liu, C.Y., Chang, K.P., et al. (2009). MicroRNA deregulation and pathway alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer.* 100, 1002-11.
- Chesi, M., Bergsagel, P.L., Brents, L.A., Smith, C.M., Gerhard, D.S. and Kuehl, W.M. (1996). Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood.* 88, 674-81.
- Chesi, M., Bergsagel, P.L., Shonukan, O.O., Martelli, M.L., Brents, L.A., Chen, T., et al. (1998). Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood.* 91, 4457-63.
- Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W.M., et al. (1997). Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet.* 16, 260-4.

- Chiang, G.G. and Abraham, R.T. (2007). Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med.* 13, 433-42.
- Chng, W.J., Glebov, O., Bergsagel, P.L. and Kuehl, W.M. (2007). Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 20, 571-96.
- Chng, W.J., Kuehl, W.M., Bergsagel, P.L. and Fonseca, R. (2008). Translocation t(4;14) retains prognostic significance even in the setting of high-risk molecular signature. *Leukemia.* 22, 459-61.
- Chng, W.J., Kumar, S., Vanwier, S., Ahmann, G., Price-Troska, T., Henderson, K., et al. (2007). Molecular dissection of hyperdiploid multiple myeloma by gene expression profiling. *Cancer Res.* 67, 2982-9.
- Claudio, J.O., Masih-Khan, E., Tang, H., Goncalves, J., Voralia, M., Li, Z.H., et al. (2002). A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. *Blood.* 100, 2175-86.
- Davies, F.E., Dring, A.M., Li, C., Rawstron, A.C., Shamma, M.A., O'Connor, S.M., et al. (2003). Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood.* 102, 4504-11.
- De Vos, J., Thykjaer, T., Tarte, K., Ensslen, M., Raynaud, P., Requirand, G., et al. (2002). Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays. *Oncogene.* 21, 6848-57.
- Decaux, O., Lode, L., Magrangeas, F., Charbonnel, C., Gouraud, W., Jezequel, P., et al. (2008). Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: a study of the Intergroupe Francophone du Myelome. *J Clin Oncol.* 26, 4798-805.
- Decaux, O., Lode, L., Minvielle, S. and Avet-Loiseau, H. (2007). Anomalies génétiques dans le myélome: rôle dans l'oncogénèse et implications pronostiques. *Rev Med Interne.* 28, 677-81.
- Decaux, O., Rodon, P., Ruelland, A., Estepa, L., Leblay, R. and Grosbois, B. (2007). Épidémiologie descriptive des gammopathies monoclonales. Expérience d'un centre hospitalier général et d'un service de médecine interne de centre hospitalier et universitaire. *Rev Med Interne.* 28, 670-6.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R. and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 15623-8.
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P.O., Bittner, M.L., Meltzer, P.S., Ray, M., et al. (1996). Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet.* 14, 457-60.
- Desikan, R., Barlogie, B., Sawyer, J., Ayers, D., Tricot, G., Badros, A., et al. (2000). Results of high-dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma: durable complete remissions and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities. *Blood.* 95, 4008-10.
- DeYoung, M.P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D. and Ellisen, L.W. (2008). Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev.* 22, 239-51.
- Dimopoulos, M., Spencer, A., Attal, M., Prince, H.M., Harousseau, J.L., Dmoszynska, A., et al. (2007). Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med.* 357, 2123-32.
- Drach, J., Ackermann, J., Fritz, E., Kromer, E., Schuster, R., Gisslinger, H., et al. (1998). Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood.* 92, 802-9.

- Durie, B.G., Harousseau, J.L., Miguel, J.S., Blade, J., Barlogie, B., Anderson, K., et al. (2006). International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 20, 1467-73.
- Durie, B.G., Jacobson, J., Barlogie, B. and Crowley, J. (2004). Magnitude of response with myeloma frontline therapy does not predict outcome: importance of time to progression in southwest oncology group chemotherapy trials. *J Clin Oncol*. 22, 1857-63.
- Durie, B.G. and Salmon, S.E. (1975). A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 36, 842-54.
- Ellisen, L.W. (2005). Growth control under stress: mTOR regulation through the REDD1-TSC pathway. *Cell Cycle*. 4, 1500-02.
- Ellisen, L.W., Ramsayer, K.D., Johannessen, C.M., Yang, A., Beppu, H., Minda, K., et al. (2002). REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Mol Cell*. 10, 995-1005.
- Faber, C., Kirchner, T. and Hlubek, F. (2009). The impact of microRNAs on colorectal cancer. *Virchows Arch*. 454, 359-67.
- Facon, T., Avet-Loiseau, H., Guillermin, G., Moreau, P., Genevieve, F., Zandecki, M., et al. (2001). Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood*. 97, 1566-71.
- Facon, T., Mary, J.Y., Hulin, C., Benboubker, L., Attal, M., Pegourie, B., et al. (2007). Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*. 370, 1209-18.
- Fan, C., Oh, D.S., Wessels, L., Weigelt, B., Nuyten, D.S., Nobel, A.B., et al. (2006). Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 355, 560-9.
- Fingar, D.C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E. and Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev*. 16, 1472-87.
- Fleming, J.A., Lightcap, E.S., Sadis, S., Thoroddsen, V., Bulawa, C.E. and Blackman, R.K. (2002). Complementary whole-genome technologies reveal the cellular response to proteasome inhibition by PS-341. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 1461-6.
- Fonseca, R., Bailey, R.J., Ahmann, G.J., Rajkumar, S.V., Hoyer, J.D., Lust, J.A., et al. (2002). Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 100, 1417-24.
- Fonseca, R., Barlogie, B., Bataille, R., Bastard, C., Bergsagel, P.L., Chesi, M., et al. (2004). Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res*. 64, 1546-58.
- Fonseca, R., Blood, E., Rue, M., Harrington, D., Oken, M.M., Kyle, R.A., et al. (2003). Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. 101, 4569-75.
- Fonseca, R., Debes-Marun, C.S., Picken, E.B., Dewald, G.W., Bryant, S.C., Winkler, J.M., et al. (2003). The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood*. 102, 2562-7.
- Fonseca, R., Harrington, D., Oken, M.M., Dewald, G.W., Bailey, R.J., Van Wier, S.A., et al. (2002). Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (delta13) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study. *Cancer Res*. 62, 715-20.

Fonseca, R., Oken, M.M., Harrington, D., Bailey, R.J., Van Wier, S.A., Henderson, K.J., et al. (2001). Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia*. 15, 981-6.

Fumarola, C., La Monica, S., Alfieri, R.R., Borra, E. and Guidotti, G.G. (2005). Cell size reduction induced by inhibition of the mTOR/S6K-signaling pathway protects Jurkat cells from apoptosis. *Cell Death Differ*. 12, 1344-57.

Garcia-Sanz, R., Gonzalez-Fraile, M.I., Mateo, G., Hernandez, J.M., Lopez-Berges, M.C., de las Heras, N., et al. (2004). Proliferative activity of plasma cells is the most relevant prognostic factor in elderly multiple myeloma patients. *Int J Cancer*. 112, 884-9.

Garcia-Sanz, R., Orfao, A., Gonzalez, M., Tabernero, M.D., Blade, J., Moro, M.J., et al. (1999). Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood*. 93, 1032-7.

Gery, S., Park, D.J., Vuong, P.T., Virk, R.K., Muller, C.I., Hofmann, W.K., et al. (2007). RTP801 is a novel retinoic acid-responsive gene associated with myeloid differentiation. *Exp Hematol*. 35, 572-8.

Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., et al. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 286, 531-7.

Greipp, P.R., Leong, T., Bennett, J.M., Gaillard, J.P., Klein, B., Stewart, J.A., et al. (1998). 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*. 91, 2501-7.

Greipp, P.R., Lust, J.A., O'Fallon, W.M., Katzmann, J.A., Witzig, T.E. and Kyle, R.A. (1993). Plasma cell labeling index and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood*. 81, 3382-7.

Greipp, P.R., Raymond, N.M., Kyle, R.A. and O'Fallon, W.M. (1985). Multiple myeloma: significance of plasmablastic subtype in morphological classification. *Blood*. 65, 305-10.

Greipp, P.R., San Miguel, J., Durie, B.G., Crowley, J.J., Barlogie, B., Blade, J., et al. (2005). International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 23, 3412-20.

Guertin, D.A. and Sabatini, D.M. (2005). An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med*. 11, 353-61.

Gunderson, K.L., Steemers, F.J., Lee, G., Mendoza, L.G. and Chee, M.S. (2005). A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet*. 37, 549-54.

Haferlach, T., Kohlmann, A., Schnittger, S., Dugas, M., Hiddemann, W., Kern, W., et al. (2005). Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood*. 106, 1189-98.

Hanamura, I., Iida, S., Akano, Y., Hayami, Y., Kato, M., Miura, K., et al. (2001). Ectopic expression of MAFB gene in human myeloma cells carrying (14;20)(q32;q11) chromosomal translocations. *Jpn J Cancer Res*. 92, 638-44.

Hanamura, I., Stewart, J.P., Huang, Y., Zhan, F., Santra, M., Sawyer, J.R., et al. (2006). Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*. 108, 1724-32.

Hari, P.N., Zhang, M.J., Roy, V., Perez, W.S., Bashey, A., To, L.B., et al. (2009). Is the international staging system superior to the Durie-Salmon staging system? A comparison in multiple myeloma patients undergoing autologous transplant. *Leukemia*.

Harousseau, J.L., Attal, M., Moreau, P., Garban, F., Facon, T. and Avet-Loiseau, H. (2006). The Prognostic Impact of Complete Remission (CR) Plus Very Good Partial Remission (VGPR) in a Double-Transplantation Program for Newly Diagnosed Multiple Myeloma (MM). Combined Results of the IFM 99 Trials. *Blood*. 108, 3077a.

Harousseau, J.L., Mathiot, C., Attal, M., Marit, G., Caillet, D., Hulin, C., et al. (2008). Bortezomib/dexamethasone versus VAD as induction prior to autologous stem cell transplantation (ASCT) in previously untreated multiple myeloma (MM): Updated data from IFM 2005/01 trial. *J Clin Oncol*. 26, 8505a.

Hideshima, T., Nakamura, N., Chauhan, D. and Anderson, K.C. (2001). Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*. 20, 5991-6000.

Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J., et al. (2001). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 61, 3071-6.

Holleman, A., Cheek, M.H., den Boer, M.L., Yang, W., Veerman, A.J., Kazemier, K.M., et al. (2004). Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med*. 351, 533-42.

Hulin, C., Virion, J.M., de Coiteux, V., Rodon, P., Pegourie, B., Benboubker, L., et al. (2007). Melphalan-prednisone-thalidomide (MP-T) is also superior to melphalan-prednisone (MP) in patients 75 years of age or older with untreated multiple myeloma (MM). Preliminary results of the randomized, double-blind, placebo controlled IFM 01-01 trial. *Haematologica*. 92 (suppl 2), 66.

Hussein, M.A., Baz, R., Srkalovic, G., Agrawal, N., Suppiah, R., Hsi, E., et al. (2006). Phase 2 study of pegylated liposomal doxorubicin, vincristine, decreased-frequency dexamethasone, and thalidomide in newly diagnosed and relapsed-refractory multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 81, 889-95.

IMWG (2003). Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 121, 749-57.

IPI (1993). A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*. 329, 987-94.

Jagannath, S., Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Irwin, D., Stadtmauer, E.A., et al. (2007). Bortezomib appears to overcome the poor prognosis conferred by chromosome 13 deletion in phase 2 and 3 trials. *Leukemia*. 21, 151-7.

Jego, G., Robillard, N., Puthier, D., Amiot, M., Accard, F., Pineau, D., et al. (1999). Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood*. 94, 701-12.

Jenner, M.W., Leone, P.E., Walker, B.A., Ross, F.M., Johnson, D.C., Gonzalez, D., et al. (2007). Gene mapping and expression analysis of 16q loss of heterozygosity identifies WWOX and CYLD as being important in determining clinical outcome in multiple myeloma. *Blood*. 110, 3291-300.

Kapoor, P., Kumar, S., Fonseca, R., Lacy, M.Q., Witzig, T.E., Hayman, S.R., et al. (2009). Impact of risk stratification on outcome among patients with multiple myeloma receiving initial therapy with lenalidomide and dexamethasone. *Blood*.

Keats, J.J., Reiman, T., Maxwell, C.A., Taylor, B.J., Larratt, L.M., Mant, M.J., et al. (2003). In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood*. 101, 1520-9.

Klein, B., Zhang, X.G., Jourdan, M., Content, J., Houssiau, F., Aarden, L., et al. (1989). Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*. 73, 517-26.

- Kristinsson, S.Y., Landgren, O., Dickman, P.W., Derolf, A.R. and Bjorkholm, M. (2007). Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003. *J Clin Oncol.* 25, 1993-9.
- Kumar, S.K., Rajkumar, S.V., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Hayman, S.R., Buadi, F.K., et al. (2008). Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood.* 111, 2516-20.
- Kyle, R.A. (1978). Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases. *Am J Med.* 64, 814-26.
- Kyle, R.A., Gertz, M.A., Witzig, T.E., Lust, J.A., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., et al. (2003). Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 78, 21-33.
- Kyle, R.A., Leong, T., Li, S., Oken, M.M., Kay, N.E., Van Ness, B., et al. (2006). Complete response in multiple myeloma: clinical trial E9486, an Eastern Cooperative Oncology Group study not involving stem cell transplantation. *Cancer.* 106, 1958-66.
- Kyle, R.A. and Rajkumar, S.V. (2004). Multiple myeloma. *N Engl J Med.* 351, 1860-73.
- Kyle, R.A. and Rajkumar, S.V. (2006). Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol.* 134, 573-89.
- Kyle, R.A. and Rajkumar, S.V. (2007). Epidemiology of the plasma-cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol.* 20, 637-64.
- Kyle, R.A. and Rajkumar, S.V. (2009). Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia.* 23, 3-9.
- Kyle, R.A., Remstein, E.D., Therneau, T.M., Dispenzieri, A., Kurtin, P.J., Hodnefield, J.M., et al. (2007). Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med.* 356, 2582-90.
- Kyle, R.A., Therneau, T.M., Rajkumar, S.V., Larson, D.R., Plevak, M.F., Offord, J.R., et al. (2006). Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 354, 1362-9.
- Kyle, R.A., Therneau, T.M., Rajkumar, S.V., Offord, J.R., Larson, D.R., Plevak, M.F., et al. (2002). A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 346, 564-9.
- Lahuerta, J.J., Martinez-Lopez, J., Serna, J.D., Blade, J., Grande, C., Alegre, A., et al. (2000). Remission status defined by immunofixation vs. electrophoresis after autologous transplantation has a major impact on the outcome of multiple myeloma patients. *Br J Haematol.* 109, 438-46.
- Lahuerta, J.J., Mateos, M.V., Martinez-Lopez, J., Rosinol, L., Sureda, A., de la Rubia, J., et al. (2008). Influence of pre- and post-transplantation responses on outcome of patients with multiple myeloma: sequential improvement of response and achievement of complete response are associated with longer survival. *J Clin Oncol.* 26, 5775-82.
- Lai, J.L., Zandecki, M., Mary, J.Y., Bernardi, F., Izydorczyk, V., Flactif, M., et al. (1995). Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood.* 85, 2490-7.
- Landgren, O., Kyle, R.A., Pfeiffer, R.M., Katzmann, J.A., Caporaso, N.E., Hayes, R.B., et al. (2009). Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood.*
- Landowski, T.H., Megli, C.J., Nullmeyer, K.D., Lynch, R.M. and Dorr, R.T. (2005). Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca<sup>2+</sup> is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Res.* 65, 3828-36.

- Leleu, X., Coiteux, V. and Facon, T. (2006). Facteurs pronostiques et nouveaux traitements du myélome multiple. *Rev Prat.* 56, 31-9.
- Lenhoff, S., Hjorth, M., Turesson, I., Westin, J., Gimsing, P., Wisloff, F., et al. (2006). Intensive therapy for multiple myeloma in patients younger than 60 years. Long-term results focusing on the effect of the degree of response on survival and relapse pattern after transplantation. *Haematologica.* 91, 1228-33.
- Lenhoff, S., Hjorth, M., Westin, J., Brinch, L., Backstrom, B., Carlson, K., et al. (2006). Impact of age on survival after intensive therapy for multiple myeloma: a population-based study by the Nordic Myeloma Study Group. *Br J Haematol.* 133, 389-96.
- Lin, L., Qian, Y., Shi, X. and Chen, Y. (2005). Induction of a cell stress response gene RTP801 by DNA damaging agent methyl methanesulfonate through CCAAT/enhancer binding protein. *Biochemistry.* 44, 3909-14.
- Lin, L., Stringfield, T.M., Shi, X. and Chen, Y. (2005). Arsenite induces a cell stress-response gene, RTP801, through reactive oxygen species and transcription factors Elk-1 and CCAAT/enhancer-binding protein. *Biochem J.* 392, 93-102.
- Loffler, D., Brocke-Heidrich, K., Pfeifer, G., Stocsits, C., Hackermuller, J., Kretzschmar, A.K., et al. (2007). Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood.* 110, 1330-3.
- Lokhorst, H.M., Meuwissen, O.J., Verdonck, L.F. and Dekker, A.W. (1992). High-risk multiple myeloma treated with high-dose melphalan. *J Clin Oncol.* 10, 47-51.
- Lotze, M.T., Wang, E., Marincola, F.M., Hanna, N., Bugelski, P.J., Burns, C.A., et al. (2005). Workshop on cancer biometrics: identifying biomarkers and surrogates of cancer in patients: a meeting held at the Masur Auditorium, National Institutes of Health. *J Immunother.* 28, 79-119.
- Ludwig, H., Durie, B.G., Bolejack, V., Turesson, I., Kyle, R.A., Blade, J., et al. (2008). Myeloma in patients younger than age 50 years presents with more favorable features and shows better survival: an analysis of 10 549 patients from the International Myeloma Working Group. *Blood.* 111, 4039-47.
- Magrangeas, F., Lode, L., Wuilleme, S., Minvielle, S. and Avet-Loiseau, H. (2005). Genetic heterogeneity in multiple myeloma. *Leukemia.* 19, 191-4.
- Magrangeas, F., Nasser, V., Avet-Loiseau, H., Llorion, B., Decaux, O., Granjeaud, S., et al. (2003). Gene expression profiling of multiple myeloma reveals molecular portraits in relation to the pathogenesis of the disease. *Blood.* 101, 4998-5006.
- Mateo, G., Montalban, M.A., Vidriales, M.B., Lahuerta, J.J., Mateos, M.V., Gutierrez, N., et al. (2008). Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol.* 26, 2737-44.
- Matsuzaki, H., Dong, S., Loi, H., Di, X., Liu, G., Hubbell, E., et al. (2004). Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nat Methods.* 1, 109-11.
- Matzner, Y., Benbassat, J. and Polliack, A. (1978). Prognostic factors in multiple myeloma: a retrospective study using conventional statistical methods and a computer program. *Acta Haematol.* 60, 257-68.
- McElwain, T.J. and Powles, R.L. (1983). High-dose intravenous melphalan for plasma-cell leukaemia and myeloma. *Lancet.* 2, 822-4.

- McMillin, D., Negri, J., Delmore, J., Hayden, P.J., Ooi, M., Mitsiades, N., et al. (2007). Activity of New Heat Shock Protein 90 (hsp90) Inhibitor NVP-AUY922 Against Myeloma Cells Sensitive and Resistant to Conventional Agents. *Blood*. 110, 1587a.
- McShane, L.M., Altman, D.G., Sauerbrei, W., Taube, S.E., Gion, M. and Clark, G.M. (2005). REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Eur J Cancer*. 41, 1690-6.
- Merlini, G., Waldenstrom, J.G. and Jayakar, S.D. (1980). A new improved clinical staging system for multiple myeloma based on analysis of 123 treated patients. *Blood*. 55, 1011-9.
- Minvielle, S. (2007). Puces à ADN: techniques et apports en cancérologie. *Rev Med Interne*. 28, 662-6.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N.S., McMullan, C.J., Poulaki, V., Kung, A.L., Davies, F.E., et al. (2006). Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood*. 107, 1092-100.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Poulaki, V., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., et al. (2002). Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 14374-9.
- Moreau, P., Attal, M., Garban, F., Hulin, C., Facon, T., Marit, G., et al. (2007). Heterogeneity of t(4;14) in multiple myeloma. Long-term follow-up of 100 cases treated with tandem transplantation in IFM99 trials. *Leukemia*. 21, 2020-4.
- Moreau, P., Facon, T., Leleu, X., Morineau, N., Huyghe, P., Harousseau, J.L., et al. (2002). Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood*. 100, 1579-83.
- MRC (1980). Prognostic features in the third MRC myelomatosis trial. Medical Research Council's Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Cancer*. 42, 831-40.
- Mulligan, G., Mitsiades, C., Bryant, B., Zhan, F., Chng, W.J., Roels, S., et al. (2007). Gene expression profiling and correlation with outcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood*. 109, 3177-88.
- Munshi, N., Li, C., Minvielle, S., Amin, S., Moreau, P., Magrangeas, F., et al. (2008). Alternate Splicing Is a Frequent Event and Impacts Clinical Outcome in Myeloma: A High-Density Exon Array Analysis of Uniformly Treated Newly-Diagnosed Myeloma Patients. *Blood*. 112, 498a.
- Myeloma Trialists' Collaborative Group (1998). Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. Myeloma Trialists' Collaborative Group. *J Clin Oncol*. 16, 3832-42.
- Norfolk, D., Child, J.A., Cooper, E.H., Kerruish, S. and Ward, A.M. (1980). Serum beta 2-microglobulin in myelomatosis: potential value in stratification and monitoring. *Br J Cancer*. 42, 510-5.
- Ocqueteau, M., Orfao, A., Almeida, J., Blade, J., Gonzalez, M., Garcia-Sanz, R., et al. (1998). Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol*. 152, 1655-65.
- Paiva, B., Vidriales, M.B., Cervero, J., Mateo, G., Perez, J.J., Montalban, M.A., et al. (2008). Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 112, 4017-23.
- Pajares, M.J., Ezponda, T., Catena, R., Calvo, A., Pio, R. and Montuenga, L.M. (2007). Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol*. 8, 349-57.

- Palumbo, A., Bringhen, S., Caravita, T., Merla, E., Capparella, V., Callea, V., et al. (2006). Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. *Lancet*. 367, 825-31.
- Pellat-Deceunynck, C., Bataille, R., Robillard, N., Harousseau, J.L., Rapp, M.J., Juge-Morineau, N., et al. (1994). Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood*. 84, 2597-603.
- Pichiorri, F., Suh, S.S., Ladetto, M., Kuehl, M., Palumbo, T., Drandi, D., et al. (2008). MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 12885-90.
- Pollack, J.R., Sorlie, T., Perou, C.M., Rees, C.A., Jeffrey, S.S., Lonning, P.E., et al. (2002). Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 12963-8.
- Preudhomme, C., Facon, T., Zandecki, M., Vanrumbeke, M., Lai, J.L., Nataf, E., et al. (1992). Rare occurrence of P53 gene mutations in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 81, 440-3.
- Quackenbush, J. (2006). Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med*. 354, 2463-72.
- Rabbitts, T.H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*. 372, 143-9.
- Raje, N., Kumar, S., Hideshima, T., Ishitsuka, K., Chauhan, D., Mitsiades, C., et al. (2004). Combination of the mTOR inhibitor rapamycin and CC-5013 has synergistic activity in multiple myeloma. *Blood*. 104, 4188-93.
- Rajkumar, S.V., Fonseca, R., Lacy, M.Q., Witzig, T.E., Therneau, T.M., Kyle, R.A., et al. (1999). Plasmablastic morphology is an independent predictor of poor survival after autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 17, 1551-7.
- Rajkumar, S.V., Hayman, S.R., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Geyer, S.M., Kabat, B., et al. (2005). Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood*. 106, 4050-3.
- Rajkumar, S.V., Kyle, R.A., Therneau, T.M., Melton, L.J., 3rd, Bradwell, A.R., Clark, R.J., et al. (2005). Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 106, 812-7.
- Rawstron, A.C., Orfao, A., Beksac, M., Bezdicikova, L., Brooimans, R.A., Bumbea, H., et al. (2008). Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 93, 431-8.
- Raymond, E., Alexandre, J., Faivre, S., Vera, K., Materman, E., Boni, J., et al. (2004). Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 22, 2336-47.
- Reece, D., Song, K.W., Fu, T., Roland, B., Chang, H., Horsman, D.E., et al. (2009). Influence of cytogenetics in patients with relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone: adverse effect of deletion 17p13. *Blood*.
- Richardson, P.G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., et al. (2005). Clinical factors predictive of outcome with bortezomib in patients with relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood*. 106, 2977-81.
- Richardson, P.G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., et al. (2003). A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*. 348, 2609-17.

Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M., Irwin, D., Stadtmauer, E., Facon, T., et al. (2007). Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood*. 110, 3557-60.

Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Irwin, D., Stadtmauer, E.A., Facon, T., et al. (2005). Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 352, 2487-98.

Robillard, N., Pellat-Deceunynck, C. and Bataille, R. (2005). Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood*. 105, 4845-8.

Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Fisher, R.I., et al. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 346, 1937-47.

Sagaster, V., Ludwig, H., Kaufmann, H., Odelga, V., Zojer, N., Ackermann, J., et al. (2007). Bortezomib in relapsed multiple myeloma: response rates and duration of response are independent of a chromosome 13q-deletion. *Leukemia*. 21, 164-8.

San Miguel, J.F., Almeida, J., Mateo, G., Blade, J., Lopez-Berges, C., Caballero, D., et al. (2002). Immunophenotypic evaluation of the plasma cell compartment in multiple myeloma: a tool for comparing the efficacy of different treatment strategies and predicting outcome. *Blood*. 99, 1853-6.

San Miguel, J.F. and Garcia-Sanz, R. (2005). Prognostic features of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 18, 569-83.

San Miguel, J.F., Garcia-Sanz, R., Gonzalez, M., Moro, M.J., Hernandez, J.M., Ortega, F., et al. (1995). A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. *Blood*. 85, 448-55.

San Miguel, J.F., Schlag, R., Khuageva, N.K., Dimopoulos, M.A., Shpilberg, O., Kropff, M., et al. (2008). Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 359, 906-17.

Schaar, C.G., Kluin-Nelemans, J.C., le Cessie, S., Franck, P.F., te Marvelde, M.C. and Wijermans, P.W. (2004). Early response to therapy and survival in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 125, 162-6.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 270, 467-70.

Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P.O. and Davis, R.W. (1996). Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 10614-9.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., et al. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 7, 3.

Schwarzer, R., Tondera, D., Arnold, W., Giese, K., Klippel, A. and Kaufmann, J. (2005). REDD1 integrates hypoxia-mediated survival signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene*. 24, 1138-49.

Shaughnessy, J., Jr., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L., Zhan, F., Tian, E., et al. (2001). Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood*. 98, 217-23.

Shaughnessy, J., Jr., Tian, E., Sawyer, J., McCoy, J., Tricot, G., Jacobson, J., et al. (2003). Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence in situ hybridization-defined chromosome 13 deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II. *Br J Haematol*. 120, 44-52.

Shaughnessy, J., Jr., Zhan, F., Barlogie, B. and Stewart, A.K. (2005). Gene expression profiling and multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 18, 537-52.

- Shaughnessy, J.D., Jr., Haessler, J., van Rhee, F., Anaissie, E., Pineda-Roman, M., Cottler-Fox, M., et al. (2007). Testing standard and genetic parameters in 220 patients with multiple myeloma with complete data sets: superiority of molecular genetics. *Br J Haematol.* 137, 530-6.
- Shaughnessy, J.D., Jr., Zhan, F., Burington, B.E., Huang, Y., Colla, S., Hanamura, I., et al. (2007). A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood.* 109, 2276-84.
- Shi, L., Reid, L.H., Jones, W.D., Shippy, R., Warrington, J.A., Baker, S.C., et al. (2006). The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol.* 24, 1151-61.
- Shi, Y., Gera, J., Hu, L., Hsu, J.H., Bookstein, R., Li, W., et al. (2002). Enhanced sensitivity of multiple myeloma cells containing PTEN mutations to CCI-779. *Cancer Res.* 62, 5027-34.
- Shi, Y., Yan, H., Frost, P., Gera, J. and Lichtenstein, A. (2005). Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther.* 4, 1533-40.
- Shibata, T., Ikeda, Y., Isobe, T., Ota, H. and Nimi, M. (1973). [Prolonged survival in a case of multiple myeloma treated with high dose of melphalan]. *Rinsho Ketsueki.* 14, 619-25.
- Shimizu, Y., Kato, H. and Schull, W.J. (1990). Studies of the mortality of A-bomb survivors. 9. Mortality, 1950-1985: Part 2. Cancer mortality based on the recently revised doses (DS86). *Radiat Res.* 121, 120-41.
- Shoshani, T., Faerman, A., Mett, I., Zelin, E., Tenne, T., Gorodin, S., et al. (2002). Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol.* 22, 2283-93.
- Smadja, N.V., Bastard, C., Brigaudeau, C., Leroux, D. and Fruchart, C. (2001). Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 98, 2229-38.
- Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C.M. and Ellisen, L.W. (2005). Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol.* 25, 5834-45.
- Sparano, J.A. and Paik, S. (2008). Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol.* 26, 721-8.
- Stewart, A.K., Bergsagel, P.L., Greipp, P.R., Dispenzieri, A., Gertz, M.A., Hayman, S.R., et al. (2007). A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patient counseling and choice of therapy. *Leukemia.* 21, 529-34.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 15545-50.
- Tarte, K., De Vos, J., Thykjaer, T., Zhan, F., Fiol, G., Costes, V., et al. (2002). Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts. *Blood.* 100, 1113-22.
- Tarte, K., Zhan, F., De Vos, J., Klein, B. and Shaughnessy, J., Jr. (2003). Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood.* 102, 592-600.
- Tian, E., Zhan, F., Walker, R., Rasmussen, E., Ma, Y., Barlogie, B., et al. (2003). The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 349, 2483-94.

- Tonon, G., Wong, K.K., Maulik, G., Brennan, C., Feng, B., Zhang, Y., et al. (2005). High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 9625-30.
- Tsai, W.C., Hsu, P.W., Lai, T.C., Chau, G.Y., Lin, C.W., Chen, C.M., et al. (2008). MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.*
- Tusher, V.G., Tibshirani, R. and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 5116-21.
- van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., et al. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 415, 530-6.
- van de Velde, H.J., Liu, X., Chen, G., Cakana, A., Deraedt, W. and Bayssas, M. (2007). Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. *Haematologica.* 92, 1399-406.
- van de Vijver, M.J., He, Y.D., van't Veer, L.J., Dai, H., Hart, A.A., Voskuil, D.W., et al. (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 347, 1999-2009.
- Venables, J.P., Klinck, R., Bramard, A., Inkel, L., Dufresne-Martin, G., Koh, C., et al. (2008). Identification of alternative splicing markers for breast cancer. *Cancer Res.* 68, 9525-31.
- Ventura, A. and Jacks, T. (2009). MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell.* 136, 586-91.
- Walker, B.A., Leone, P.E., Jenner, M.W., Li, C., Gonzalez, D., Johnson, D.C., et al. (2006). Integration of global SNP-based mapping and expression arrays reveals key regions, mechanisms, and genes important in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood.* 108, 1733-43.
- Wang, H., Kubica, N., Ellisen, L.W., Jefferson, L.S. and Kimball, S.R. (2006). Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *J Biol Chem.* 281, 39128-34.
- Wang, Z., Lo, H.S., Yang, H., Gere, S., Hu, Y., Buetow, K.H., et al. (2003). Computational analysis and experimental validation of tumor-associated alternative RNA splicing in human cancer. *Cancer Res.* 63, 655-7.
- Wang, Z., Malone, M.H., Thomenius, M.J., Zhong, F., Xu, F. and Distelhorst, C.W. (2003). Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. *J Biol Chem.* 278, 27053-8.
- Weber, D.M., Chen, C., Niesvizky, R., Wang, M., Belch, A., Stadtmauer, E.A., et al. (2007). Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *N Engl J Med.* 357, 2133-42.
- Weiss, B.M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R.S. and Kuehl, W.M. (2009). A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood.*
- Yakoub-Agha, I., Attal, M., Dumontet, C., Delannoy, V., Moreau, P., Berthou, C., et al. (2002). Thalidomide in patients with advanced multiple myeloma: a study of 83 patients--report of the Intergroupe Francophone du Myelome (IFM). *Hematol J.* 3, 185-92.
- Yan, H., Frost, P., Shi, Y., Hoang, B., Sharma, S., Fisher, M., et al. (2006). Mechanism by which mammalian target of rapamycin inhibitors sensitize multiple myeloma cells to dexamethasone-induced apoptosis. *Cancer Res.* 66, 2305-13.

Zandecki, M., Lai, J.L., Genevieve, F., Bernardi, F., Volle-Remy, H., Blanchet, O., et al. (1997). Several cytogenetic subclones may be identified within plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, both at diagnosis and during the indolent course of this condition. *Blood*. 90, 3682-90.

Zhan, F., Barlogie, B., Arzoumanian, V., Huang, Y., Williams, D.R., Hollmig, K., et al. (2007). Gene-expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood*. 109, 1692-700.

Zhan, F., Barlogie, B., Mulligan, G., Shaughnessy, J.D., Jr. and Bryant, B. (2008). High-risk myeloma: a gene expression based risk-stratification model for newly diagnosed multiple myeloma treated with high-dose therapy is predictive of outcome in relapsed disease treated with single-agent bortezomib or high-dose dexamethasone. *Blood*. 111, 968-9.

Zhan, F., Hardin, J., Kordsmeier, B., Bumm, K., Zheng, M., Tian, E., et al. (2002). Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood*. 99, 1745-57.

Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J.P., Hanamura, I., Gupta, S., et al. (2006). The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. 108, 2020-8.

Zhan, F., Tian, E., Bumm, K., Smith, R., Barlogie, B. and Shaughnessy, J., Jr. (2003). Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development. *Blood*. 101, 1128-40.

Zimmermann, J., Erdmann, D., Lalande, I., Grossenbacher, R., Noorani, M. and Furst, P. (2000). Proteasome inhibitor induced gene expression profiles reveal overexpression of transcriptional regulators ATF3, GADD153 and MAD1. *Oncogene*. 19, 2913-20.

# RESUME

## RECHERCHE DE MARQUEURS MOLECULAIRES PREDICTIFS DANS LE MYELOME MULTIPLE.

L'évolution des patients atteints de myélome est très hétérogène avec des survies allant de quelques mois à plus de 10 ans. Les analyses par hybridation in situ en fluorescence sur cellules interphasiques (FISH) ont permis de démontrer l'impact pronostique des anomalies génétiques dans le myélome. Les techniques de génomique (dites de « puces à ADN ») permettent une analyse globale au niveau de l'ADN ou de l'ARN. Les premières puces à ADN développées consistaient à analyser les profils d'expression génique et ont été utilisées avec succès en oncologie. Notre équipe a utilisé ces techniques dans le myélome multiple. Notre objectif principal était de développer des marqueurs moléculaires prédictifs dans le myélome. Nos travaux nous ont permis : (1) de démontrer que l'hétérogénéité clinique et biologique du myélome était associée à une hétérogénéité moléculaire et de fournir une explication quant à la gravité de sous types biologiques de myélome. (2) d'identifier un groupe de 15 gènes dont l'expression est associée à la survie et de proposer un score prédictif de la survie. (3) de démontrer que l'inhibition de la voie mTOR via l'expression d'un gène de réponse au stress (REDD1) est un mécanisme potentiel de résistance à l'association bortezomib-dexaméthasone. Les techniques de génomique sont arrivées à maturité et permettent maintenant l'étude des variations du nombre de copies d'ADN à l'échelle du génome et d'analyser les modifications post-transcriptionnelles. Ces techniques devraient permettre d'améliorer nos connaissances sur la physiopathologie du myélome multiple et d'identifier des marqueurs moléculaires prédictifs performants. L'enjeu est maintenant le transfert des résultats de recherche en pratique clinique quotidienne.

**Mots-clés :** myélome, profils d'expression, génomique, pronostic.

## RESEARCH OF PREDICTIVE MOLECULAR MARKERS IN MULTIPLE MYELOMA.

Survival of patients with multiple myeloma is highly heterogeneous, from periods of a few months to more than 10 years. Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis have demonstrated the prognostic impact of genetic abnormalities in myeloma. DNA chips provide a comprehensive analysis at the level of DNA or RNA. The first DNA chips aimed to analyze gene expression profiles and have been used successfully in cancer. We employed these techniques to study multiple myeloma. Our main objective was to develop predictive molecular markers in multiple myeloma. Our results (1) revealed that the clinical and biological heterogeneity of myeloma is associated with a molecular heterogeneity and provide explanations about severity of subtypes of myeloma. (2) identified a group of 15 genes whose expression is associated with survival and led us to propose a predictive score of survival. (3) revealed a possible novel mechanism of bortezomib resistance in myeloma patients mediated by REDD1 overexpression involving inhibition of mTOR activity. Genomics techniques are now mature and allow genome-wide DNA copy number abnormalities analyses as well as gene expression regulation. These tools should provide new insights into pathophysiology of multiple myeloma and lead to identification of new predictive markers. The challenge is now to transfer these results in clinical practice.

**Key words:** myeloma, genomic, expression profile, prognosis.