



HAL
open science

Identification fine des cellules plasmocytaires normales et tumorales dans la moelle osseuse de patients atteints de myélome multiple en cytométrie en flux

Elina Alaterre

► To cite this version:

Elina Alaterre. Identification fine des cellules plasmocytaires normales et tumorales dans la moelle osseuse de patients atteints de myélome multiple en cytométrie en flux. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT010 . tel-02502295

HAL Id: tel-02502295

<https://theses.hal.science/tel-02502295>

Submitted on 9 Mar 2020

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

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



THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences chimiques
et biologiques pour la santé (CBS2)

Et de l'unité de recherche UMR9002 CNRS-UM
Institut de Génétique Humaine

Spécialité : **Biologie Santé**

Présentée par **Elina ALATERRE**

**Identification fine des cellules plasmocytaires
normales et tumorales dans la moelle osseuse
de patients atteints de myélome multiple en
cytométrie en flux**

Soutenue le 3 mai 2017 devant le jury composé de

M Jérôme Moreaux, MCU, IGH Montpellier
M Sébastien Raimbault, DR, HORIBA Montpellier
Mme Lydia Campos, PU-PH, CHU de St Etienne
Mme Catherine Pellat, DR, Université de Nantes

Directeur de thèse
Co-encadrant
Président du jury
Rapporteur

Au cours de mes trois années de thèse, j'ai bénéficié d'un financement CIFRE (ANRT). J'ai réalisé mes travaux dans le cadre du projet DAT@DIAG financé par BPI France (projet ISI).



HORIBA
Medical

HORIBA Médical
Parc Euromédecine – 390 rue du Caducée – BP 7290
34090 Montpellier Cedex 4 – France



Laboratoire de Suivi des Thérapies Innovantes
Département d'hématologie
CHRU de Montpellier – Hôpital St Eloi
80, avenue Augustin Fliche
34295 Montpellier Cedex 5 – France

Résumé

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne caractérisée par la prolifération d'un clone plasmocytaire tumoral dans la moelle osseuse et d'une accumulation d'une immunoglobuline monoclonale dans le sérum et/ou les urines. La diversité des anomalies cytogénétiques, rendant la maladie plus ou moins agressive, et la variabilité de la réponse au traitement font du MM une maladie hétérogène. Le MM reste incurable dans la majorité des cas avec une médiane de survie de 5 à 7 ans. La rechute après traitement est due à la persistance de cellules tumorales au sein de la moelle osseuse, appelée maladie résiduelle ou en anglais « Minimal Residual Disease » (MRD). La cytométrie en flux multiparamétrique (CFM) est une technique sensible, simple et rapide qui permet d'identifier et de caractériser des cellules d'intérêt dans un échantillon biologique. C'est dans le but de simplifier le suivi de la MRD du MM que nous avons développé une solution complète basée sur la CFM. Cette solution comprend (i) la conception d'un panel à 5 couleurs, composés des anticorps (Ac) anti-CD38, anti-kappa et anti-lambda pour identifier les plasmocytes totaux et de deux pools d'Ac couplés au même fluorochrome (anti-CD19/anti-CD27, pool négatif et anti-CD56/anti-CD117/anti-CD200, pool positif) pour détecter les plasmocytes tumoraux ; (ii) le développement d'un préparateur afin d'automatiser l'ensemble des étapes de préparation de l'échantillon ; et (iii) l'automatisation de l'analyse des résultats de CFM grâce à un logiciel que nous avons créé. Cette solution simple et entièrement automatisée permet d'augmenter la reproductibilité et la productivité, de diminuer le coût du test, sans altérer la sensibilité ou la spécificité. En parallèle de ces travaux, nous avons construit un score de risque simple basé sur l'expression de gènes codant pour des protéines de surface (CD24, CD27, CD36 et CD302) permettant de prédire la survie des patients atteints de MM au diagnostic ainsi qu'à la rechute.

Mots clefs : Myélome multiple, Plasmocytes, Maladie résiduelle, Cytométrie en flux, Immunophénotypage.

Abstract

Multiple myeloma (MM) is a hematological malignancy characterized by clonal plasma cell proliferation in bone marrow and abnormal monoclonal immunoglobulin accumulation in the serum and/or urine. The heterogeneity of the disease is partly due to the cytogenetic abnormalities diversity making the disease more or less aggressive. MM is incurable in the majority of cases with a median survival between 5 and 7 years. The persistence of abnormal plasma cells in bone marrow after treatment is called minimal residual disease (MRD) and leads to the patient relapse. Multiparametric flow cytometry (MFC) is a sensitive, simple and fast technique to identify and characterize cells of interest in biological samples. In order to simplify MRD follow-up we have developed a complete solution based on MFC. This solution includes (i) the 5-color panel design, composed of anti-CD38, anti-kappa and anti-lambda antibodies (Ab) to identify total plasma cell population and two pools of Ab paired to the same fluorophore (anti-CD19/anti-CD27, negative pool and anti-CD56/anti-CD117/anti-CD200, positive pool) to detect abnormal plasma cells; (ii) the development of a device used to automatically prepare biological samples before MFC; and (iii) the analysis automation of MFC results using a homemade software. This fully automated solution increases reproducibility and productivity, decreases processing and analyzing time as well as test cost, without affecting sensibility and specificity. In parallel, we have built a simple risk score based on gene expression encoding surface proteins (CD24, CD27, CD36 and CD302) providing MM patient outcome at diagnostic and MRD follow-up.

Keywords: Multiple myeloma, Plasma cells, Residual disease, Flow cytometry, Immunophenotyping.

Remerciements

Comme le veut la tradition, je vais tenter de remercier toutes les personnes qui ont en quelque sorte contribué, de près ou de loin, à cette thèse.

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Jérôme Moreaux, de m'avoir encadrée tout au long de cette thèse. Je te remercie pour le temps que tu auras su me consacrer entre toutes tes obligations, réunions, congrès et publications de l'équipe.

Je souhaite ensuite remercier Sylvain Jacquemin de m'avoir accueillie au sein de son équipe Innovation et de m'avoir offert l'opportunité de faire cette thèse.

Je souhaite remercier Sébastien Raimbault pour le co-encadrement de cette thèse.

Je remercie chaleureusement tous les membres de mon jury, Catherine Pellat et Lydia Campos, de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que Caroline Bret et Martin Villalba, pour avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse pendant ces trois ans.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire STI et à la grande famille Horibarienne. Je m'excuse par avance si j'oublie quelqu'un.

Merci à vous Guilhem, Nico, Stéphanie, Hugues, Ouissem, Mathieu, Albou, Michel, et toi Laurie, pour votre bonne humeur, votre aide, votre temps, vos conseils (et vos lignées !!!) lors de mes manip au laboratoire STI. Un grand MERCI à Jean-Michel, Martine et HK pour votre encadrement tout au long de cette thèse, vos précieux conseils, votre soutien, vos nombreuses relectures de publications, de brevets et du manuscrit. Merci au service réactif et notamment à Laurence, Anaïs, Jocelyne, Aurélien et Christophe pour votre aide lors de mes formulations de réactifs au bat E. Un grand merci à la fine équipe Thomas/Pat pour m'avoir plus qu'aidé à développer cette maquette, pour votre temps et votre franc parler ! Merci au service qualité et particulièrement à Marlène, Vivien et Jérôme qui m'ont permis d'analyser mes résultats avec leurs machines.

Je tiens à remercier particulièrement mes professeurs d'IUT, et notamment Stéph, Mumu et Philou pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche, de la biologie et de la bio-informatique, qui n'était pas encore la grande discipline telle qu'on la connaît aujourd'hui. Merci de m'avoir encadrée durant ces stages, d'avoir été mes modèles et de m'avoir donné envie de prolonger mes études jusqu'à cette thèse. Je souhaite remercier également Adrien Nivoliez pour m'avoir poussé à partir de mon Cantal afin de découvrir d'autres horizons. Enfin, merci à tous mes camarades geeks de l'IUT

d'Aurillac, et spécialement merci à Damien, Jerem, Grizz et Ju pour ces belles années de découverte et de formation à la bio-informatique.

Je souhaite remercier l'ensemble de la Team Jeune Croissant (#TJC), ceux qui restent, Alex (le gars attentionné), Antoine (le grand frère), Coralie (la copine de Trip), Dorian (le deuxième papa), Enoch (le futur Obama d'Horiba), Marc (le comique), Michael (le premier papa), Remi (le gars en retard), et ceux qui sont déjà partis, Camille (la « no filtre ») et Vincent. Merci aux autres jeunes, Cécile (l'éternelle jeune) et Benoit, qui mangeaient déjà leurs croissants le mercredi avec leur service. Merci aux moins jeunes, Guy (le rugbyman du XXe siècle) et Serge (le calme) pour les pauses repas du midi animées par des débats en tout genre, en outre par le rugby. Le lundi c'était debrief des matchs du WE, le vendredi c'était pronostics. Merci à vous pour la belle ambiance que vous avez su créer dans cette entreprise, pour votre grand soutien tout au long de la thèse, pour nos belles randonnées, soirées, et j'en passe... et merci d'être bien plus que de simples collègues de boulot.

Je souhaite également remercier mes badistes et mon équipe de rugby, pas pour mes blessures, mais pour m'avoir permis de me défouler les soirs de la semaine et les WE.

Je souhaite remercier de tout mon cœur mes parents et mon frère pour votre amour et pour m'avoir toujours soutenue et encouragée tout au long de mes études, malgré la distance.

Enfin, je souhaite remercier mon conjoint, Dim. Même si tu n'as pas été présent depuis le début de cette aventure, tu as su l'être et surtout le rester durant les derniers mois de cette thèse, sûrement les plus durs... Merci de m'avoir soutenue, d'avoir toujours cru en moi, d'avoir été à l'écoute, d'avoir pris soin de moi et de ma cheville ces journées d'octobre et d'avoir préparé ces petits plats les soirs où je rentrais du sport ou tout simplement lorsque j'étais trop fatiguée de ces journées... Merci ♥

Sommaire

| | |
|--|----|
| Abréviations | 1 |
| Table des illustrations..... | 4 |
| Synthèse bibliographique..... | 8 |
| Chapitre I : Le Myélome Multiple..... | 9 |
| I. Introduction à l'hématologie..... | 9 |
| II. La maladie du myélome multiple | 11 |
| 1. Les signes de la maladie et le diagnostic..... | 12 |
| 2. Les classifications Salmon-Durie et ISS..... | 12 |
| 3. Les traitements du MM..... | 14 |
| a. Les traitements standards | 14 |
| b. Les avancées thérapeutiques | 15 |
| 4. La maladie résiduelle..... | 16 |
| a. Critères d'évaluation de la réponse au traitement | 16 |
| b. Techniques d'évaluation de la MRD..... | 18 |
| III. Le plasmocyte normal | 18 |
| 1. Production des Ig..... | 18 |
| 2. La différenciation plasmocytaire | 19 |
| a. Différenciation au niveau de la moelle osseuse..... | 19 |
| b. Différenciation au niveau des organes lymphoïdes | 21 |
| IV. L'hétérogénéité moléculaire du MM | 23 |
| 1. Les anomalies cytogénétiques du MM..... | 23 |
| a. Les évènements oncogéniques primaires | 23 |
| b. Les évènements oncogéniques secondaires | 24 |
| 2. L'étude du transcriptome dans le MM..... | 25 |
| a. Généralités sur les puces à ADN..... | 25 |
| b. La classification moléculaire du MM par GEP | 26 |
| c. Scores de risque basés sur le GEP dans le MM | 27 |
| 3. Le séquençage à haut débit dans le MM..... | 28 |
| Chapitre II : La cytométrie en flux multiparamétrique..... | 30 |
| I. Introduction à la CFM..... | 30 |

| | | |
|---|---|----|
| 1. | Principe de la CFM | 30 |
| 2. | Cas particulier d'un automate d'hématologie | 31 |
| a. | Mesure par variation d'impédance | 31 |
| b. | Mesure par diffraction optique | 32 |
| c. | Les automates d'hématologie d'HORIBA Médical | 32 |
| II. | Profil immunophénotypique | 33 |
| 1. | Généralités | 33 |
| 2. | Caractéristiques phénotypiques des plasmocytes normaux..... | 34 |
| a. | Marqueur leucocytaire | 34 |
| b. | Marqueurs des cellules B | 34 |
| c. | Marqueurs des plasmocytes | 35 |
| 3. | Caractéristiques phénotypiques des plasmocytes myélomateux..... | 36 |
| 4. | Les sous-clones plasmocytaires..... | 38 |
| III. | Place de la CFM dans la prise en charge du MM..... | 38 |
| 1. | Suivi de la MRD en CFM | 39 |
| 2. | Valeur pronostique de la MRD | 39 |
| 3. | Panels de détection des plasmocytes dans le cadre du MM | 41 |
| a. | Première génération de CFM | 41 |
| b. | Seconde génération de CFM | 42 |
| 4. | Stratégie d'identification des plasmocytes | 42 |
| IV. | Autres techniques de détection des plasmocytes tumoraux..... | 43 |
| 1. | ASO-PCRq | 43 |
| 2. | Séquençage nouvelle génération | 44 |
| 3. | Comparaison des techniques de suivi de la MRD du MM..... | 45 |
| Chapitre III : La préparation biologique..... | | 47 |
| I. | Prélèvement d'un échantillon sanguin ou médullaire | 47 |
| II. | Enrichissement cellulaire..... | 47 |
| 1. | Lyse cellulaire | 48 |
| a. | Caractéristiques de la membrane érythrocytaire | 48 |
| b. | L'hémolyse par lyse chimique | 49 |
| i. | Solubilisation de la membrane | 49 |
| ii. | Choc osmotique..... | 51 |

| | | |
|---|--|----|
| 2. | Centrifugation..... | 51 |
| 3. | La filtration | 52 |
| a. | Propriétés impliquées dans la filtration | 53 |
| i. | Composition des filtres..... | 53 |
| ii. | Propriétés du filtre | 54 |
| iii. | Propriétés cellulaires | 54 |
| b. | Déplétion leucocytaire | 54 |
| c. | Enrichissement leucocytaire..... | 55 |
| III. | Immunophénotypage..... | 57 |
| 1. | Fixation | 57 |
| 2. | Perméabilisation..... | 58 |
| Chapitre IV : L'analyse de données biologiques..... | | 60 |
| I. | Analyse de résultats de biopuce..... | 60 |
| 1. | Normalisation des données..... | 60 |
| 2. | Méthodes d'analyse des données..... | 60 |
| a. | Analyse différentielle de l'expression de gènes | 60 |
| b. | Classification..... | 61 |
| 3. | Logiciels d'analyse des données de biopuces | 62 |
| II. | Analyse de résultats de CFM | 62 |
| 1. | Analyse manuelle des résultats..... | 62 |
| 2. | Inconvénients du fenêtrage manuel | 63 |
| 3. | Automatisation de l'analyse des résultats | 64 |
| a. | Définition des données..... | 64 |
| b. | Méthodes supervisées..... | 64 |
| c. | Méthodes non supervisées | 65 |
| i. | Modèles basés sur l'algorithme des k-means | 65 |
| ii. | Modèles de mélanges finis..... | 66 |
| iii. | Modèles basés sur l'exploration spatiale des histogrammes..... | 67 |
| d. | Comparaison des différentes méthodes | 68 |
| Objectifs de la thèse | | 69 |
| Résultats | | 71 |

| | |
|--|-----|
| Article 1 | 73 |
| Article 2 | 74 |
| Résultats préliminaires | 76 |
| Etude 1 : Optimisation du protocole de préparation manuelle d'un échantillon de moelle osseuse | 76 |
| 1. Lyse érythrocytaire | 77 |
| 2. Immunophénotypage | 80 |
| a. Fixation | 80 |
| b. Perméabilisation | 81 |
| 3. Conclusions | 82 |
| Etude 2 : Développement d'un préparateur | 84 |
| 1. Description de la maquette | 84 |
| 2. Langage et cycles | 85 |
| 3. Intégration de la filtration dans la maquette | 85 |
| a. Présélection des filtres | 85 |
| b. Automatisation de la filtration | 87 |
| 4. Conclusions et perspectives | 92 |
| Discussion et Perspectives | 94 |
| Conclusion générale | 107 |
| Annexes | 109 |
| Annexe 1 | 111 |
| Annexe 2 | 112 |
| Annexe 3 | 113 |
| Références bibliographiques | 115 |

Abréviations

A

Ac : Anticorps

AcM : Anticorps Monoclonaux

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP : Adénosine Diphosphate

Ag : Antigène

ARN : Acide ribonucléique

ASO-PCRq : *Allele Specific Oligonucleotide*
PCRq

B

BAFF : *B-cell activating factor*

BIC : *Bayesian Information Criteria*

BCR : *B cell receptor*

C

CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne
en HGB

CCND1 : Cycline D1

CCND3 : Cycline D3

CD : Cluster de Différenciation

CGMP : Cellule Granulocyte-Macrophage
Progénitrice

C_H : domaine constant de l'IgH

CFM : Cytométrie en Flux Multiparamétrique

C_L : domaine constant de l'IgL

CMEP : Cellule Mégacaryocyte-Erythroïde
Progénitrice

CR : *Complete Remission*

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

F

FGFR3 : *Fibroblast Growth Factor Receptor 3*

FISH : *Fluorescence in situ Hybridization*

FSC : *Forward Scatter*

G

GB : Globule Blanc

GEP : *Gene Expression Profiling*

GR : Globule rouge

H

HCT : Hématocrite

HGB : Hémoglobine

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

I

ICL : *Integrated Complete Likelihood*

Ig : Immunoglobuline

IgH : Chaîne lourde

IgL : Chaîne légère

IMiD : *Immunomodulatory Drug*

IMWG : *International Myeloma Working Group*

ISS : *International Staging System*

K

κ : kappa

L

λ : lambda

LOD : *Limit Of Detection*

M

MGUS : *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*

MM : Myélome Multiple

MRD : *Minimal Residual Disease*

N

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NF-KB : *Nuclear Factor Kappa B*

NFS : Numération Formule Sanguine

NGS : Next-Generation Sequencing

NH₄Cl : Chlorure d'Ammonium

NK : Lymphocyte *Natural Killer*

P

PBS : *Phosphate-Buffered Saline*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PCRq : PCR quantitative

PFA : Paraformaldéhyde

PLT : Plaquette

PR : *Partial Response*

PVDF : Difluorure de Polyvinylidène

R

R-ISS : ISS révisé

S

sCR : *Stringent CR*

SLAM : *Signaling lymphocytic activation molecule 1*

SSC : *Side Scatter*

T

TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en HGB

V

V_H : domaine variable de l'IgH

V_L : domaine variable de l'IgL

VGPR : *Very Good Partial Response*

Table des illustrations

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse..... | 9 |
| Figure 2 : Schéma de la ligne de traitement dans le cas du MM. | 15 |
| Figure 3 : Corrélation entre la profondeur de la réponse et la survie des patients..... | 17 |
| Figure 4 : Représentation schématique d'une Ig. | 19 |
| Figure 5 : La différenciation des cellules lymphocytaires B, de la cellule souche au plasmocyte..... | 21 |
| Figure 6 : Schéma du fonctionnement d'une biopuce affymetrix. | 26 |
| Figure 7 : Les scores GEP70 et IFM15 prédisent la survie globale des patients atteints de MM au diagnostic. | 28 |
| Figure 8 : Représentation schématique d'un exemple de système de CFM..... | 30 |
| Figure 9 : Schéma d'un système fluide hydrofocalisé. | 33 |
| Figure 10 : Exemple d'immunophénotypage de populations leucocytaires..... | 34 |
| Figure 11 : Profil phénotypique des plasmocytes normaux et tumoraux..... | 37 |
| Figure 12 : Valeur pronostique de la MRD. | 40 |
| Figure 13 : Technique ASO-PCR et génération d'oligonucléotides spécifiques des régions variables (V_H), de diversité (D_H), de jonction (J_H) et constantes (C_H) d'IgH. | 44 |
| Figure 14 : Schématisation de la méthode de séquençage LymphoSight™ ciblant les régions VDJ d'Ig pour le suivi de la MRD du MM..... | 45 |
| Figure 15 : Composition de la membrane érythrocytaire. | 48 |
| Figure 16 : Schéma du fonctionnement de la solubilisation de la membrane cellulaire par des tensioactifs grâce à la formation de micelles..... | 49 |
| Figure 17 : Représentation schématique de la lyse successive des GR puis des GB en fonction de la concentration en tensioactif et du temps d'incubation..... | 50 |
| Figure 18 : Représentation schématique des mécanismes élémentaires de la rétention de cellules lors d'une filtration en profondeur. | 53 |
| Figure 19 : Schéma de l'enrichissement leucocytaire par filtration à partir d'un composé sanguin ou médullaire. | 56 |
| Figure 20 : Différents fenêtrages possibles..... | 63 |
| Figure 21 : Différentes étapes du protocole de préparation d'un échantillon de moelle osseuse comprenant les temps d'incubation (en bleu) et les temps de lavage par centrifugation (en rouge). .. | 77 |
| Figure 22 : Comparaison de la lyse NH_4Cl et de la lyse à base de saponine. | 79 |
| Figure 23 : Préservation des GB et lyse totale des GR à T20h avec la lyse à base de saponine (n=4) .. | 79 |
| Figure 24 : Suivi de l'intensité de fluorescence des Ac dirigés vers CD19, CD27, CD38, CD56 et CD200 (n=3) et CD117 (n=1) sur des cellules non fixées et fixées..... | 81 |

| | |
|---|----|
| Figure 25 : Suivi de l'intensité de fluorescence des Ac dirigés vers CD19, CD27, CD38, CD56, CD117 et CD200 sur des cellules non perméabilisées et perméabilisées..... | 82 |
| Figure 26 : Optimisation du protocole de préparation d'un échantillon de moelle osseuse comprenant les temps d'incubation (en bleu) et les temps de lavage en centrifugation (en rouge). | 83 |
| Figure 27 : Maquette du préparateur d'échantillons biologiques de face (A) et de côté (B). | 85 |
| Figure 28 : Schéma du système de filtration manuelle. | 86 |
| Figure 29 : Observation microscopique de la surface des filtres (A) en acétate de cellulose (www.sartorius-france.fr) et en (B) polycarbonate (www.merckmillipore.com). | 87 |
| Figure 30 : Schéma simplifié du système de filtration automatique. | 88 |
| Figure 31 : Pourcentage de leucocytes récupérés avec les filtres en polycarbonate et en acétate de cellulose (n=10) par rapport à la concentration en leucocytes de l'échantillon de sang initial..... | 89 |
| Figure 32 : Proportion des sous-populations leucocytaires. | 90 |
| Figure 33 : Pourcentage de leucocytes, d'érythrocytes et de PLT (ou débris cellulaires) par rapport à l'échantillon de départ suite à des lavages successifs après la lyse érythrocytaire et la filtration (n=9). | 91 |
| Figure 34 : Marquage en CFM des cellules récupérées après centrifugation et filtration à partir de sang lysé. | 92 |

| | |
|--|----|
| Tableau I : Valeurs hématologiques normales. | 10 |
| Tableau II : Pourcentage normal des sous-populations leucocytaires de la moelle osseuse. | 11 |
| Tableau III : Classification du MM selon les systèmes Salmon-Durie et ISS..... | 13 |
| Tableau IV : Les différents groupes moléculaires..... | 27 |
| Tableau V : Liste des CD les plus communément utilisés pour détecter les plasmocytes tumoraux. .. | 38 |
| Tableau VI : Comparaison des techniques de CFM, de l'ASO-PCRq et de séquençages selon différents critères pour le suivi de la MRD du MM..... | 46 |
| Tableau VII : Densité et volume corpusculaire des différentes cellules sanguines..... | 52 |
| Tableau VIII : Lignées cellulaires sélectionnées pour le suivi de l'intensité de fluorescence des Ac de notre panel | 80 |
| Tableau IX : Différents filtres sélectionnés pour la filtration après lyse érythrocytaire. | 86 |

Synthèse bibliographique

« La théorie, c'est quand on sait tout mais que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne mais que personne ne sait pourquoi. »

Albert Einstein

Chapitre I : Le Myélome Multiple

I. Introduction à l'hématologie

L'hématologie est une discipline médicale dédiée à l'étude du sang, des organes hématopoïétiques (moelle osseuse, ganglions lymphatiques et rate) et de leurs pathologies, appelées hémopathies. Ces pathologies vont des hémopathies bénignes comme l'anémie aux hémopathies malignes telles que la leucémie, le lymphome ou encore les syndromes myélodysplasiques ou myéloprolifératifs.

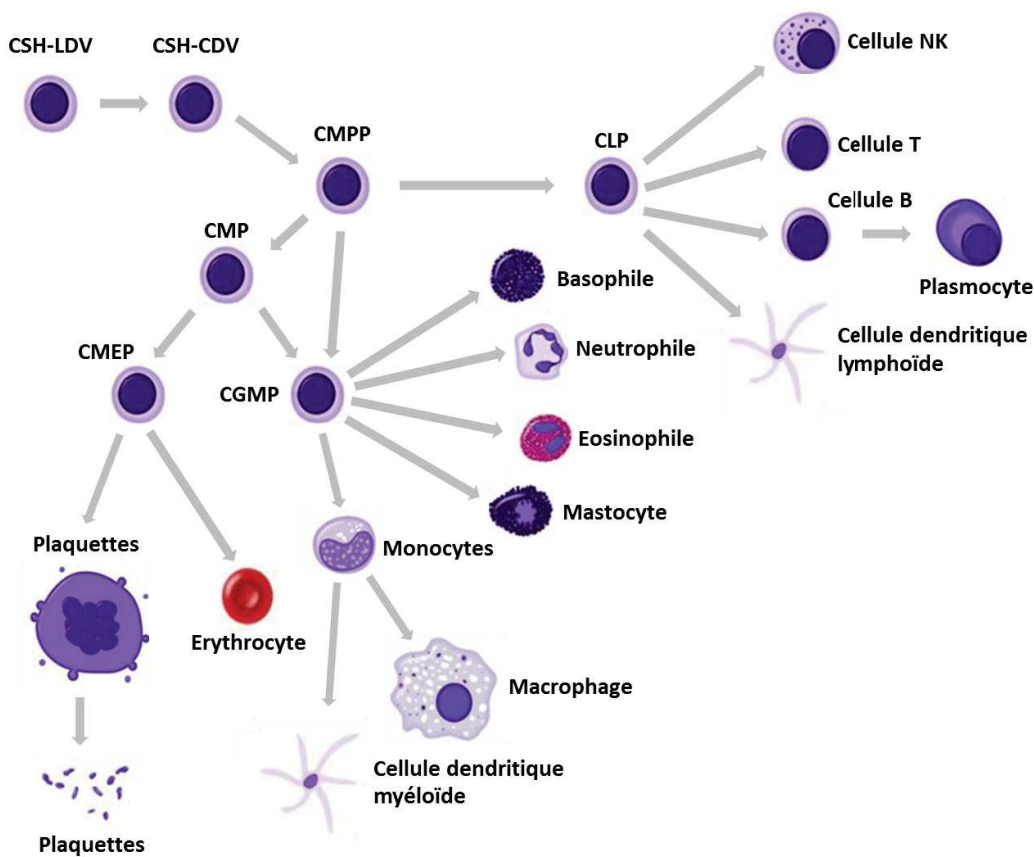


Figure 1 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse.

CSH-LDV : cellule souche hématopoïétique à longue durée de vie, CSH-CDV : CSH à courte durée de vie, CMPP : cellule multipotente progénitrice, CLP : cellule lymphoïde progénitrice, CMP : cellule myéloïde progénitrice, CMEP : cellule mégacaryocyte-érythroïde progénitrice, CGMP : cellule granulocyte-macrophage progénitrice (Bruin et al., 2014).

La production de l'ensemble des cellules du sang, l'hématopoïèse, est réalisée au sein de la moelle osseuse. Le sang est composé majoritairement d'érythrocytes, de leucocytes et de thrombocytes appelés plus familièrement globules rouges (GR), globules blancs (GB) et plaquettes (PLT), respectivement. Les différentes lignées cellulaires proviennent d'une unique cellule souche hématopoïétique (CSH). A partir de cette cellule, deux grandes lignées vont être générées : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde. La cellule lymphoïde progénitrice peut générer des cellules dendritiques, des lymphocytes NK (« Natural Killer »), des lymphocytes T et des lymphocytes B pouvant se différencier en plasmocytes. La cellule myéloïde progénitrice peut donner naissance à une cellule mégacaryocyte-érythroïde progénitrice (CMEP) ou une cellule granulocyte-macrophage progénitrice (CGMP). La CMEP permet la production d'érythrocytes et de mégacaryocytes. Ces derniers sont des cellules géantes dont le cytoplasme se fragmente en milliers de PLT. La CGMP génère les leucocytes granuleux (basophiles, neutrophiles, éosinophiles et mastocytes) et les monocytes qui peuvent se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques (*Figure 1*) (Bruin et al., 2014).

L'analyse d'un prélèvement de sang, l'hémogramme, permet d'évaluer l'hématopoïèse avec un prélèvement non invasif. Cet examen consiste à mesurer quantitativement les différentes populations cellulaires sanguines (GR, GB et PLT), c'est la numération sanguine. Lors de cet examen, d'autres paramètres sont mesurés comme la concentration en hémoglobine (HGB) et le volume globulaire moyen, ou calculés tels que l'hématocrite (HCT), la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) (*Tableau IA*). La numération sanguine est souvent associée au calcul qualitatif de la formule sanguine. Cette dernière permet d'apprécier les concentrations différentielles des populations leucocytaires : les neutrophiles, les lymphocytes, les monocytes, les éosinophiles et les basophiles (*Tableau IB*). L'évaluation de l'ensemble de ces paramètres est appelée numération formule sanguine (NFS).

Tableau I : Valeurs hématologiques normales.

(A) Mesure quantitative de la numération sanguine et (B) calcul qualitatif de la formule sanguine

(Lewis, 2006).

| A | Homme | | Femme | |
|------------|------------------|------------------|----------------|--|
| | GR | 4,5 à 6,0 Tera/l | 4 à 5,5 Tera/l | |
| HCT | 40-54 l/l | | 37-47 l/l | |
| HGB | 13-17 g/dl | | 12-16 g/dl | |
| VGM | 82-98 fl | | | |
| TCMH | 27-32 pg | | | |
| CCMH | 32-36 % | | | |
| GB | 4 à 10 Giga/l | | | |
| Plaquettes | 100 à 450 Giga/l | | | |

| B | Pourcentage par rapport aux leucocytes totaux | |
|--------------|---|-----------|
| | Neutrophiles | 50 à 80 % |
| Lymphocytes | 20 à 40 % | |
| Monocytes | 2 à 10 % | |
| Eosinophiles | 1 à 4 % | |
| Basophiles | 0 à 1 % | |

Dans certains cas, l'hémogramme révèle une anomalie et l'analyse d'un prélèvement de moelle osseuse, un myélogramme, est nécessaire pour confirmer le diagnostic d'une pathologie. Il consiste à étaler l'échantillon sur une lame et à observer et compter les différentes populations cellulaires au microscope (*Tableau II*).

Tableau II : Pourcentage normal des sous-populations leucocytaires de la moelle osseuse.

(Bates, 2006)

| Populations | Pourcentage par rapport aux cellules totales |
|-----------------------|--|
| Neutrophiles | 22-46 % |
| Eosinophiles | 0,3-4 % |
| Basophiles | 0-0,5 % |
| Lymphocytes | 5-20 % |
| Monocytes | 0-3 % |
| Plasmocytes | 0-3,5 % |
| Erythroblastes | 5-35 % |
| Mégacaryocytes | 0-2 % |

II. La maladie du myélome multiple

Le myélome multiple (MM) ou maladie de Kahler est une hémopathie maligne caractérisée par la prolifération d'un clone plasmocytaire tumoral dans la moelle osseuse et d'une accumulation d'une immunoglobuline (Ig) monoclonale (protéine M) dans le sérum et/ou les urines. Le MM est la seconde hémopathie maligne la plus fréquente après le lymphome et représente 10 à 15% des hémopathies malignes et 1% des cancers. Cette pathologie touche environ 20 000 nouveaux patients en Europe et le même nombre aux Etats-Unis (Raab et al., 2009; Teitelbaum et al., 2013). L'âge médian au diagnostic est de 66 ans (Kyle et al., 2003).

Le MM évolue à partir d'un stade asymptomatique appelé gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS, « Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance »). Les MGUS sont détectées chez 2 à 4% des sujets âgés de 60 ans, 10% des sujets âgés de 70 ans, 20% des sujets âgés de 80 ans. Les MGUS évoluent vers un myélome avec un taux de 1% par an, indépendamment de la date de diagnostic du MGUS. Certains cas ne développent pas d'anomalie clinique ou biologique, on parle alors de myélome asymptomatique ou indolent (en anglais « smoldering multiple myeloma »). A l'opposé de cette catégorie de myélome, une forme plus agressive existe, la leucémie à plasmocytes définie par la circulation des cellules tumorales dans le

sang. Cette forme peut survenir chez des patients sans antécédent myélomateux ou lors des stades avancés du MM.

1. Les signes de la maladie et le diagnostic

Le MM peut être suspecté suite à des douleurs ou des lésions osseuses et/ou une altération de l'état général (asthénie, anorexie, amaigrissement et exceptionnellement fièvre). La prolifération des cellules plasmocytaires, dont le rôle principal est de produire et sécréter des Ig, entraîne l'accumulation de cette protéine monoclonale. L'Ig peut être détectée sous sa forme complète ou sous forme de chaînes légères libres dans le sang ou dans les urines. L'accumulation de cette protéine a pour conséquence l'augmentation de la viscosité du sang et de la vitesse de sédimentation. Les patients peuvent manifester une insuffisance rénale associée à l'accumulation de l'Ig monoclonale, et une hypercalcémie due aux complications osseuses. Une perturbation du système immunitaire peut être également observée, entraînant des phénomènes d'immunodépresseions qui facilitent les infections bactériennes, ainsi qu'un risque accru de thrombose veineuse principalement lié aux thérapies employées. Les critères de CRAB, incluant l'élévation du niveau de Calcium, le dysfonctionnement Rénal, l'Anémie et les lésions osseuses (« Bone lesions »), permettent de diagnostiquer le MM et de le différencier du MGUS et du MM indolent (Rajkumar, 2015).

Les résultats de certains examens réalisés à partir d'un prélèvement sanguin comme la NFS, l'évaluation de la vitesse de sédimentation et/ou le dosage de composés sanguins (protéines totales, urée, créatinine, calcium et $\beta 2$ microglobuline) permettent de suspecter un MM. Pour confirmer le diagnostic de cette pathologie, deux examens sont réalisés, l'électrophorèse des protéines dans le sang et les urines, et le myélogramme. Des radiographies du squelette permettent de rechercher d'éventuelles atteintes osseuses. L'immunophénotypage en cytométrie en flux multiparamétrique (CFM) (Morice et al., 2007) et les techniques de biologie moléculaire – l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (Hartmann et al., 2011), la réaction en chaîne par polymérisation (PCR) (Martinez-Lopez et al., 2013) et le séquençage (Vij et al., 2014) – viennent compléter ce panel d'examens et permettent de détecter les cellules tumorales et les anomalies génétiques liées à la maladie lors du diagnostic.

2. Les classifications Salmon-Durie et ISS

Les signes cliniques précédemment cités permettent de distinguer les cas de MM et de reconnaître les différents stades de la maladie. Le système Salmon-Durie, utilisé jusqu'en 2005, est composé de trois stades (I, II, III) distingués selon l'évaluation de quatre critères : le dosage de la protéine M, le

nombre de lésions osseuses, les valeurs de l'hémoglobine et le dosage du calcium dans le sérum (Durie and Salmon, 1975). Le système ISS (« International Staging System »), plus simple et utilisé depuis 2005, est basé sur l'évaluation de deux critères sanguins qui sont la $\beta 2$ microglobuline et l'albumine. La combinaison des résultats de ces deux critères est un facteur pronostic fort de la survie des patients atteints de MM (Greipp et al., 2005). De plus, ce système peu coûteux permet aux cliniciens de proposer un traitement efficace et personnalisé. Récemment, de nouveaux critères ont été ajoutés afin d'améliorer les performances de cette classification, notamment en termes de prédiction de la survie des patients. La classification ISS révisée (R-ISS) comprend, outre les critères de l'ISS, la détection d'anomalies chromosomales (t(4;14), t(14;16) et del17p) (voir Chapitre 1 IV.1. Les anomalies cytogénétiques du MM) par FISH et l'élévation du niveau de lactate déshydrogénase dans le sérum (Kastritis et al., 2016; Palumbo et al., 2015). Le *Tableau III* résume les différents critères de ces deux systèmes.

*Tableau III : Classification du MM selon les systèmes Salmon-Durie et ISS.
(Durie and Salmon, 1975; Greipp et al., 2005; Kastritis et al., 2016)*

| Stade | Critères du système Salmon-Durie | Critères du système R-ISS |
|-------|--|--|
| I | L'ensemble de ces critères : <ul style="list-style-type: none"> • Hémoglobine >10g/dL • Niveau de calcium normal ou <12mg/dL • Pas de lésion osseuse ou un seul plasmocytome • Niveau de protéine M faible <ul style="list-style-type: none"> ○ IgG <5g/dL ○ IgA <3g/dL ○ Bence Jones protein <4g/24h | <ul style="list-style-type: none"> • B2-microglobuline sérum <3,5mg/L • Albumine sérum $\geq 3,5$g/dL • Absence d'anomalie chromosomale |
| II | Ni le stade I, ni le stade III | Ni le stade I, ni le stade III |
| III | Au moins un de ces critères : <ul style="list-style-type: none"> • Hémoglobine <8,5g/dL • Niveau de calcium >12mg/dL • Nombreuses lésions osseuses • Niveau de protéine M élevé <ul style="list-style-type: none"> ○ IgG >7g/dL ○ IgA >5g/dL ○ Bence Jones protein >12g/24h | <ul style="list-style-type: none"> • B2-microglobuline sérum $\geq 5,5$mg/L • Présence d'au moins une anomalie chromosomale parmi t(4;14), t(14;16) et del17p |

3. Les traitements du MM

a. Les traitements standards

Les MGUS et les myélomes indolents qui sont asymptomatiques ne nécessitent aucun traitement mais une surveillance clinique et biologique régulière est néanmoins nécessaire. Dans le cas d'un diagnostic de MM symptomatique, les premières approches thérapeutiques impliquaient des agents alkylants (Melphalan), des anthracyclines et des corticostéroïdes (Prednisone, Dexaméthasone). Ces derniers sont des agents anti-inflammatoires non-spécifiques permettant d'augmenter la survie des patients entre 3 et 4 ans (Hideshima and Anderson, 2002). Les traitements du MM ont été améliorés grâce à la chimiothérapie intensive combinée à une greffe de CSH (autogreffe ou allogreffe) en prolongeant cette survie entre 5 et 7 ans. De nouvelles drogues sont utilisées depuis les années 2000 : le Bortezomib (inhibiteur du protéasome), le Thalidomide (agent immunomodulateur (IMiD) aux propriétés anti-inflammatoires, anti-angiogéniques et anti-tumorales) et le Lenalidomide (molécule analogue au Thalidomide présentant moins d'effets secondaires) (Ahmad et al., 2016).

Le traitement actuel du MM repose sur trois piliers qui sont les inhibiteurs du protéasome (Bortezomib, Carfilzomib, Ixazomib), les agents immunomodulateurs (Thalidomide, Lenalidomide, Pomalidomide) et les agents alkylants (Cyclophosphamide, Melphalan), en association avec une molécule corticostéroïde (Prednisone, Dexaméthasone). Le choix du traitement repose essentiellement sur l'âge du patient (*Figure 2*).

Les sujets âgés de moins de 65 ans

Pour les jeunes patients (<65 ans) en bonnes conditions cliniques, le traitement standard est composé d'une chimiothérapie à haute dose et d'une transplantation de CSH. Le traitement d'induction standard combine le Dexaméthasone, le Thalidomide ou le Lenalidomide, et/ou le Bortezomib remplaçant les anciens protocoles à base de Vincristine, d'Adriamycine et de Dexaméthasone (Harousseau et al., 2010). Le traitement d'induction est suivi d'une première intensification par forte dose de Melphalan soutenue d'une autogreffe. Il existe des protocoles où les patients reçoivent une double autogreffe, ou très rarement une allogreffe qui peut augmenter la survie des patients voire donner lieu à une rémission moléculaire de la maladie. Cette dernière n'est pas couramment utilisée à cause des complications liées aux interactions entre le greffon et l'hôte (Bladé et al., 2010). Suite à la greffe, un traitement de consolidation et de maintenance est administré, basé sur le Thalidomide ou le Lenalidomide (Decaux et al., 2007).

tumorales ou les cellules du microenvironnement. Les AcM peuvent ainsi, en combinaison avec les nouvelles drogues (Bortezomib et IMiDs), augmenter la réponse au traitement. Ces molécules ciblent des protéines impliquées dans l'adhésion des cellules tumorales (CS1, CD138, CD56, CD38), des facteurs de croissance (IL-6, VEGF, BAFF), des récepteurs impliqués dans la croissance des cellules (IGF-1R, CD74, CD40), des récepteurs impliqués dans l'apoptose (TRAIL-R1, TRAIL-R2), des médiateurs des dérèglements osseux (RANKL, Dickkopf-1) ou d'autres protéines exprimées par les cellules tumorales (CD20, EGFR). Les AcM peuvent également induire la réponse immunitaire anti-tumeur en bloquant certaines protéines (« immunoglobuline-like receptor », PD-L1 ou CD200) (Donato et al., 2014; van de Donk et al., 2012; Engelhardt et al., 2014). Parmi ces AcM, l'Elotuzumab (anti-CS1) et le Daratumumab (anti-CD38) ont été largement introduits dans des essais cliniques. Il a été observé que l'Elotuzumab, en combinaison avec le Lenalidomide et le Dexaméthasone (Lonial et al., 2015), permet de prolonger la survie des patients par rapport aux patients bénéficiant d'un traitement sans AcM. Le daratumumab a montré une activité anti-myélome lorsqu'il était administré seul (Lokhorst et al., 2015) ou en combinaison avec d'autres drogues telles que le Bortezomib (Palumbo et al., 2016) ou le Lenalidomide (Dimopoulos et al., 2016), toutes les deux associées au Dexaméthasone. L'efficacité de ces deux AcM a tout d'abord été évaluée sur des cohortes de patients en rechute ou atteints de myélome réfractaire. Des essais cliniques sont actuellement réalisés pour évaluer l'efficacité de l'Elotuzumab (Mateos et al., 2015) et du Daratumumab (Dimopoulos et al., 2012) sur des cohortes de patients nouvellement diagnostiqués afin de les introduire dans la première ligne de traitement du MM.

4. La maladie résiduelle

Malgré les avancées thérapeutiques, le MM reste une maladie incurable pour la majorité des patients qui rechutent généralement après la première phase de traitement (Kumar et al., 2012), la médiane de survie étant de 5-7 ans (Raab et al., 2009). La maladie résiduelle, en anglais « minimal residual disease » (MRD), correspond à la persistance des cellules tumorales dans la moelle après le traitement.

a. Critères d'évaluation de la réponse au traitement

Selon l' « International Myeloma Working Group¹ » (IMWG), l'évaluation de la réponse au traitement peut être distinguée en plusieurs groupes (Durie et al., 2006) :

¹ <http://imwg.myeloma.org/>

- La rémission complète (ou CR pour « complete remission ») est définie par l'absence de protéine M dans le sang et les urines, la disparition des lésions osseuses et la présence de moins de 5% de plasmocytes dans la moelle osseuse.
- La très bonne réponse partielle (ou VGPR pour « very good partial response ») se caractérise par la détection de la protéine M en immunofixation et par son absence en électrophorèse, ou la réduction d'au moins 90% de l'Ig monoclonale sérique et un niveau d'Ig monoclonale urinaire inférieur à 100 mg/24h.
- La réponse partielle (ou PR pour « partial response ») se définit par une réduction respective de plus de 50% et 90% du taux d'Ig monoclonale sérique et urinaire et une diminution de plus de 50% des lésions osseuses.
- La maladie en progression est caractérisée par une augmentation du niveau de protéine M sérique et urinaire, de la présence de plus de 10% de plasmocytes dans la moelle osseuse, d'un développement de nouvelles ou anciennes lésions osseuses ou de l'évolution de l'hypercalcémie.

En 2011, des critères additionnels comprenant le dosage des chaînes légères dans le sang et les urines et la détection des plasmocytes grâce à de nouvelles techniques ont permis de définir un autre groupe, le « stringent » CR (sCR). La *Figure 3* schématise la profondeur de la réponse au traitement en fonction de la survie des patients.

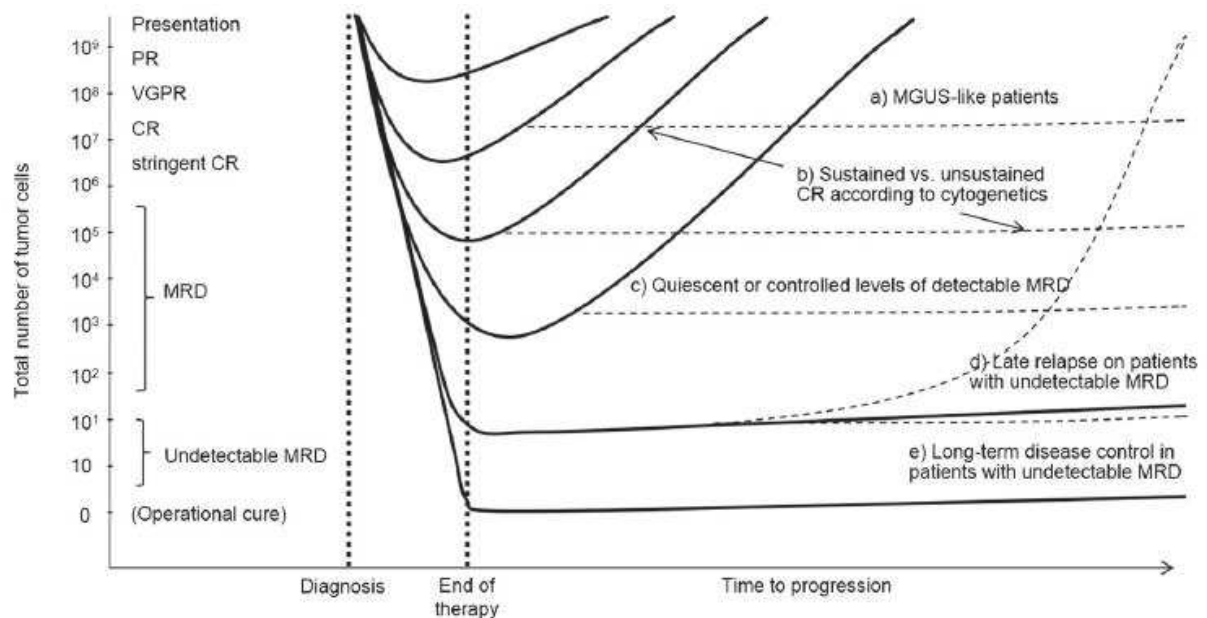


Figure 3 : Corrélation entre la profondeur de la réponse et la survie des patients.

(Paiva et al., 2015a)

b. Techniques d'évaluation de la MRD

L'évaluation de la concentration en protéines monoclonales est l'évaluation conventionnelle de la réponse au traitement. C'est un facteur pronostique de la survie globale des patients (Alexanian et al., 1972). Cependant, la demi-vie de certaines Ig étant élevée (25 jours pour les IgG), le changement de concentration de ces dernières est lent (Rawstron et al., 2015). C'est pourquoi des techniques additionnelles telles que l'évaluation de la concentration des chaînes légères dans le sérum ou l'immunofixation ont permis de redéfinir le groupe de patients en CR (Lahuerta et al., 2000; Martínez-López et al., 2015).

En 2013, la MRD est dite négative lorsque l'on compte moins d'une cellule tumorale pour 10 000 cellules normales en CFM (Rawstron et al., 2013). D'autres techniques moléculaires comme le séquençage (Ladetto et al., 2014; Martinez-Lopez et al., 2014a) ou la réaction en chaîne par polymérisation (en anglais « Polymerase Chain Reaction », PCR) (Martinez-Lopez et al., 2013; Puig et al., 2014; Putkonen et al., 2010; Sarasquete et al., 2005; Silvennoinen et al., 2014) permettent également de suivre la MRD. Ces trois techniques seront décrites dans le prochain chapitre. Depuis 2016, l'IMWG redéfinit la négativité de la MRD en abaissant le seuil de détection des cellules tumorales (1 cellule tumorale parmi 100 000 cellules totales) des techniques de CMF et de biologie moléculaire (Landgren and Rajkumar, 2016).

III. Le plasmocyte normal

Les plasmocytes sont des leucocytes issus de la lignée des lymphocytes B et représentent l'ultime stade de différenciation de ces derniers. Ils sont normalement présents dans la moelle osseuse en petite quantité (<5%). Le rôle du plasmocyte est de produire des Ig capables de reconnaître spécifiquement des antigènes (Ag) et ainsi d'activer la réponse immunitaire.

1. Production des Ig

Les Ig sont constituées de deux chaînes lourdes IgH (H pour « Heavy ») identiques reliées entre elles par des ponts disulfures et de deux chaînes légères IgL (L pour « Light ») identiques liées aux chaînes lourdes par un pont disulfure (*Figure 4*). Il existe cinq classes d'Ig (IgG, IgA, IgM, IgD et IgE) et deux types de chaînes légères (kappa, κ et lambda, λ) permettant de produire dix groupes d'Ig. Un plasmocyte n'est capable de produire qu'un seul type de chaîne légère tout au long de sa vie et le ratio normal k/l des plasmocytes est de 2/3 kappa et 1/3 lambda (Rajkumar et al., 2005b). Lorsqu'un clone plasmocytaire prolifère cette balance est alors modifiée.

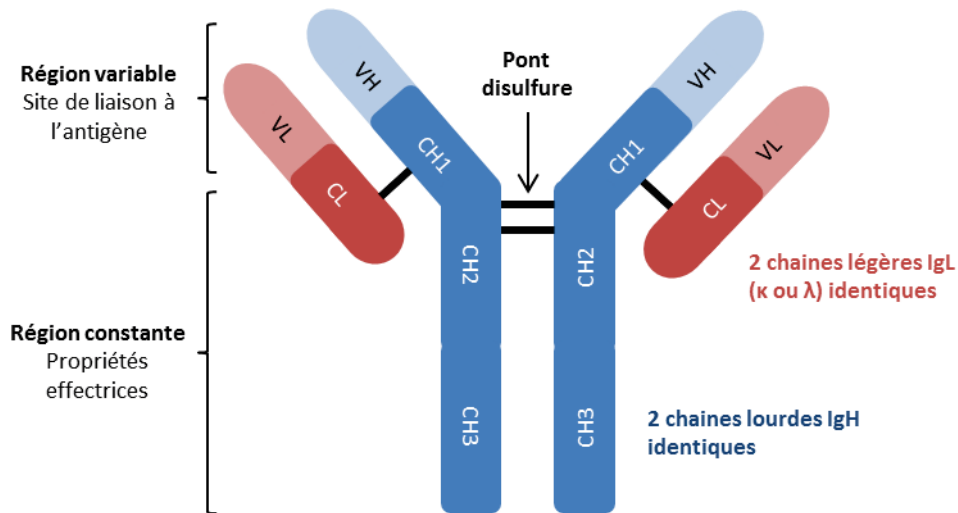


Figure 4 : Représentation schématique d'une Ig.

Elle est constituée de deux chaînes lourdes (IgH) (en bleu), chacune composée d'une région variable (V_H) et de trois domaines constants (C_{H1}, C_{H2} et C_{H3}), et associées entre elles grâce à des ponts disulfures. Les chaînes lourdes sont associées à deux chaînes légères (IgL) (en rouge), chacune composée d'un domaine variable (V_L) et d'une région constante (C_L).

Les gènes impliqués dans la synthèse des chaînes lourdes des Ig sont au nombre de quatre : V (variable), D (diversité), J (jonction) et C (constant). Dans leur configuration germinale, les Ig ne sont pas encore fonctionnelles et des recombinaisons V(D)J sont nécessaires afin de créer un large répertoire d'Ig à partir d'un nombre restreint de gènes. Les domaines variables des chaînes lourdes résultent de l'assemblage des segments V, D et J alors que les domaines variables des chaînes légères sont uniquement composés des segments V et J. Lors de la différenciation des lymphocytes B au sein des organes lymphoïdes, des hypermutations somatiques apparaissent au niveau des gènes des régions variables afin d'augmenter l'affinité Ag/Ac.

2. La différenciation plasmocytaire

a. Différenciation au niveau de la moelle osseuse

Le réarrangement des gènes d'Ig joue un rôle important dans la différenciation des lymphocytes B qui peut être divisée en quatre grands stades : la cellule pro-B, la cellule pré-B, la cellule B immature et la cellule B mature naïve.

L'ontogénèse B peut être séparée en deux phases principales : indépendante ou dépendante de la présence d'Ag respectivement dans la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes. La *Figure 5* schématise la différenciation lymphocytaire des cellules B de la cellule souche au plasmocyte. Les cellules lymphocytaires B dérivent toutes des cellules souches multipotentes indifférenciées appelées

CSH. Ces cellules perdent leur propriété de multipotence et acquièrent des fonctions propres aux lymphocytes B lors de la différenciation (Giammartino and Apostolou, 2016). Au cours de leur maturation, les cellules B vont se différencier en cellules B immatures en passant par des étapes de réarrangements des gènes d'Ig et l'expression du BCR (« B cell receptor »). Ce complexe permet l'intégration de signaux provenant du microenvironnement médullaire, notamment des cellules stromales et sert de point de contrôle dans le développement des cellules B. Ces points de contrôle permettent principalement d'évaluer l'assemblage et l'absence d'auto-réactivité du BCR (reconnaissance des Ag du soi).

Les cellules pro-B expriment à leur surface les marqueurs CD117, CD43 et CD19 ainsi que les chaînes CD79a (Ig- α) et CD79b (Ig- β) qui seront associées au complexe du BCR (Nagata et al., 1997). Dans la moelle osseuse, les cellules pro-B subissent des réarrangements au niveau des gènes de l'IgH avec une première recombinaison entre le segment D_H et J_H, puis un second réarrangement entre le segment V_H et le complexe DJ_H pour former la partie variable de la chaîne lourde. Les cellules pré-B exprimant le marqueur de surface CD25 (Rolink et al., 1994) sont alors obtenues et le complexe pré-BCR se forme. Il est composé de deux chaînes lourdes μ identiques associées à une pseudo chaîne légère et à l'hétérodimère Ig- α /Ig- β . Les cellules pré-B sont ensuite soumises à des réarrangements VJ aux loci des chaînes légères, remplaçant la pseudo chaîne légère par une chaîne légère conventionnelle. Elles se transforment en cellules B immatures possédant un BCR fonctionnel permettant la reconnaissance d'Ag et produisant des Ig sous forme d'IgM. A ce stade, les cellules B immatures n'expriment plus le marqueur CD43 et sont soumises à une sélection négative afin d'éliminer par apoptose les cellules exprimant un BCR auto-réactif pouvant développer des maladies auto-immunes. Le stade de cellule B mature naïve est caractérisé par une co-expression membranaire de l'IgM et l'IgD. Ces lymphocytes matures naïfs quittent la moelle osseuse et entrent dans la circulation sanguine périphérique jusqu'aux organes lymphoïdes pour poursuivre leur différenciation grâce à leur rencontre avec l'Ag.

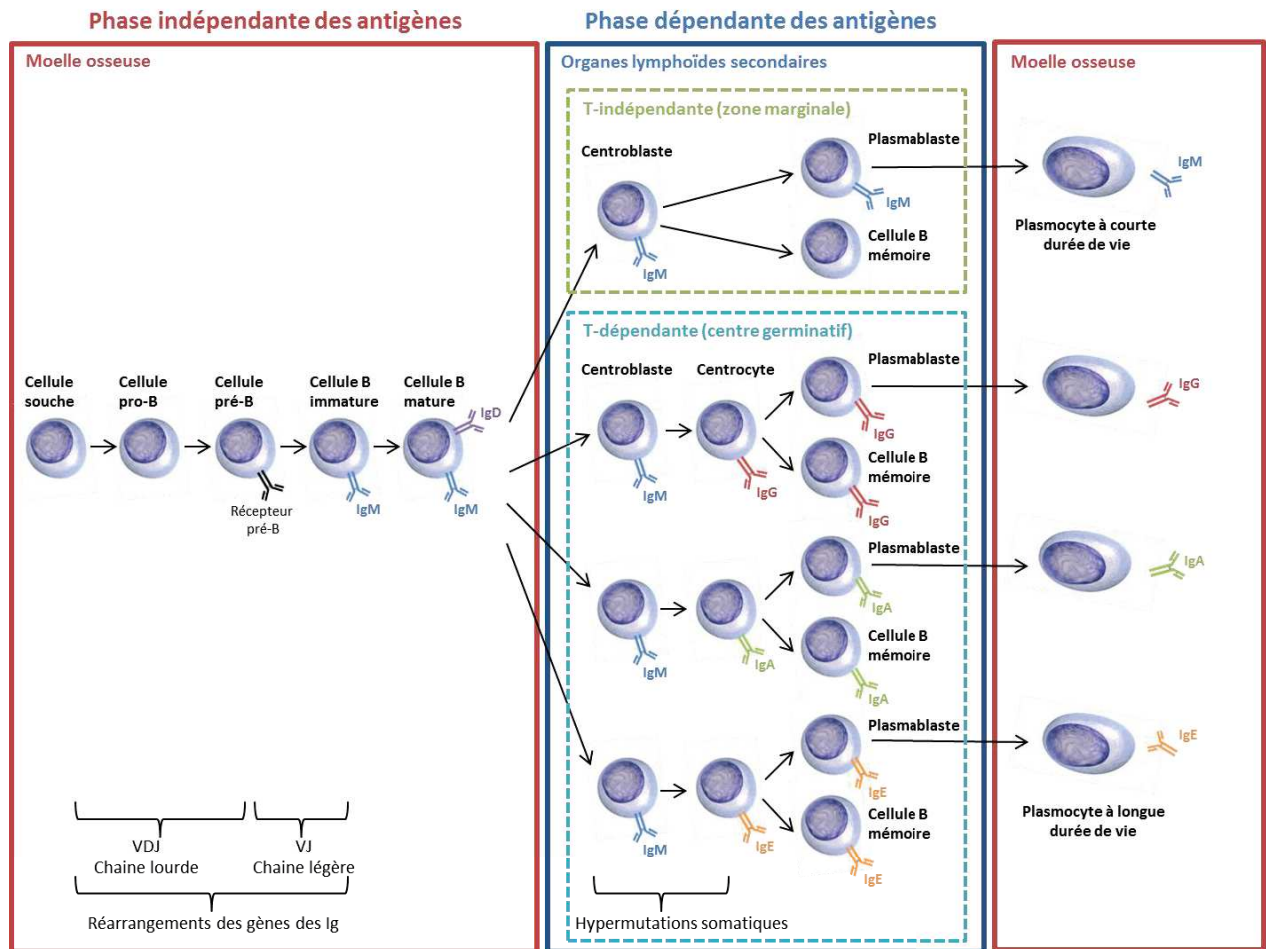


Figure 5 : La différenciation des cellules lymphocytaires B, de la cellule souche au plasmocyte.

(<https://www.univ-rennes1.fr/actualites/etude-epigenetique-des-lymphocytes-b-eclairer-lorigine-des-lymphomes>)

b. Différenciation au niveau des organes lymphoïdes

Après une première phase de différenciation dans le compartiment médullaire, les lymphocytes B migrent dans les organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses et rate) afin de poursuivre leur maturation. Ces étapes vont dépendre de la rencontre entre la cellule mature encore naïve et l'Ag présenté par les cellules dendritiques, les macrophages et d'autres cellules spécialisées. La différenciation et l'activation des cellules B par l'Ag peut être dépendante ou non des lymphocytes T. Cette deuxième phase de maturation permet de produire des Ac dont l'affinité est augmentée notamment grâce aux phénomènes d'hypermutations somatiques. Les cellules B seront alors différenciées en cellules sécrétrices d'Ig solubles ou Ac, appelées plasmocytes, ou en cellules B mémoires.

La différenciation indépendante des lymphocytes T

Les cellules B naïves reçoivent un signal d'activation après contact avec l'Ag et prolifèrent alors dans la zone marginale des organes lymphoïdes secondaires. Elles se caractérisent par une forte expression d'IgM et des marqueurs de surface CD21 et CD1d et d'une faible expression d'IgD et du marqueur CD23. Elles peuvent se différencier en plasmocytes à courte durée de vie capables de sécréter des Ac IgM de faible affinité pour l'Ag.

La différenciation dépendante des lymphocytes T

Les cellules B naïves migrent au sein de la pulpe blanche des follicules primaires (zone folliculaire) pour initier la différenciation dépendante des lymphocytes T. Cette différenciation est complexe et met en œuvre de nombreuses molécules ou complexes tel que le BCR. Les cellules B vont reconnaître un Ag sous sa forme soluble ou sous forme native à la surface des cellules dendritiques folliculaires qui vont jouer le rôle de cellules « présentatrices d'Ag ». Les lymphocytes B activés vont recevoir un signal de co-localisation avec les lymphocytes T. Une partie de ces lymphocytes B activés prolifère pour initier la réaction du centre germinatif. Le centre germinatif est divisé en deux compartiments : la zone sombre et la zone claire. Dans la zone sombre, les cellules B, appelées alors centroblastes, sont soumises à des hypermutations somatiques (introduction de mutations ponctuelles) au niveau des régions variables réarrangées des chaînes lourdes et légères de l'Ig pour augmenter leur affinité pour l'Ag. Une fois dans la zone claire, les cellules B sont appelées centrocytes exprimant un nouveau BCR modifié par les mutations. Les centrocytes rentrent en compétition pour la sélection clonale et seules les cellules avec un BCR de forte affinité survivent. A ce stade les cellules vont subir une commutation de classe pour produire un isotype différent de l'IgM/IgD afin d'acquérir de nouvelles fonctions effectrices tout en conservant l'affinité pour l'Ag. Les centrocytes quittent ensuite le centre germinatif pour se différencier en plasmablastes ou en lymphocytes B mémoire.

Les cellules B mémoires ont une longue durée de vie et peuvent répondre rapidement à une stimulation antigénique, elles constituent le répertoire immun. Elles sont capables de se différencier rapidement en plasmocytes ou de rentrer de nouveau dans le centre germinatif pour subir des remaniements secondaires afin d'améliorer l'affinité antigénique.

Les plasmablastes quittent ensuite les organes lymphoïdes secondaires pour rejoindre la moelle osseuse où ils termineront leur différenciation en plasmocytes matures. Ces plasmocytes matures à longue durée de vie sécrètent des Ig en grande quantité et de forte affinité pour l'Ag (Plonquet, 2013).

Le plasmocyte tumoral pourrait être associé à la forme plasmablastique du plasmocyte normal après sa différenciation dans le centre germinatif. Il aurait donc déjà subi les remaniements au niveau des gènes de l'Ig (hypermutations somatiques et commutation de classes). Les erreurs survenues durant le processus de différenciation vont constituer les événements oncogéniques aboutissant à l'initiation de la cellule myélomateuse et permettront de détecter les cellules tumorales grâce à des techniques de biologie moléculaire (FISH, PCR ou séquençage).

IV. L'hétérogénéité moléculaire du MM

1. Les anomalies cytogénétiques du MM

L'oncogénèse du MM a pour origine des événements oncogéniques primaires, initiant le passage de la cellule saine à la cellule tumorale grâce à l'immortalisation du plasmocyte, puis des événements oncogéniques secondaires, apportant à la cellule myélomateuse les avantages sélectifs nécessaires à sa survie et impliqués dans la progression de la maladie. Ce sont ces différents événements qui vont rendre la maladie hétérogène au niveau génétique.

a. Les événements oncogéniques primaires

Il existe une réelle diversité d'anomalies cytogénétiques chez les patients atteints de MM. Si l'on souhaite réaliser une classification de ces patients, deux grands groupes distinguent les MM hyperdiploïdes des MM non hyperdiploïdes. Ce dernier groupe est principalement composé de cas d'hypodiploïdes, de pseudodiploïdes et de tétraploïdes, et se caractérise par un taux élevé de translocations de l'IgH du locus 14q32. L'hyperdiploïdie est observée chez environ 55% des patients et est caractérisée par des trisomies impliquant principalement les chromosomes 3, 5, 7, 9, 11, 15 et 19 (Fonseca et al., 2004).

Une translocation IgH est observée chez environ 50% des patients. Les trois principales translocations de l'IgH sont la t(11;14)(q13;q32), la t(4;14)(p16;q32) et la t(14;16)(q32;q23). Ces translocations font suite à des erreurs lors du processus de réarrangement des Ig (hypermutations somatiques et commutation de classes). La translocation entraîne le rapprochement entre un oncogène et un élément activateur de la transcription ce qui provoque la transcription de cet oncogène.

- La translocation t(11;14)(q13;q32), présente chez 15 à 20% des patients, est associée à une dérégulation de la cycline D1 (CCND1) qui est impliquée dans le cycle cellulaire (Bueno et al., 2007). Cette translocation peut être observée au stade du MGUS sans toutefois évoluer durant des dizaines d'années. Il existe d'autres translocations plus rares comme la t(6;14)(p21;q32) associée à une surexpression de la cycline D3 (CCND3) (Sonoki et al., 2001). La t(11;14) est associée à une issue favorable (Soverini et al., 2003).

- La translocation $t(4;14)(p16;q32)$, présente dans 12 à 15% des cas, provoque une surexpression de l'oncogène FGFR3 (« Fibroblast Growth Factor Receptor 3 ») et de la méthyl-transférase MMSET (« Multiple Myeloma SET ») (Chesi et al., 1998) et est associée à un mauvais pronostic (Chang et al., 2004).
- Enfin, l'anomalie $t(14;16)(q32;q23)$, plus rarement observée, est associée à une surexpression d'oncogène c-maf en association avec un pronostic péjoratif (Chesi and Bergsagel, 2013). Les translocations $t(14;20)(q32;q11)$ et $t(8;14)(q24;q32)$ dérèglent respectivement les oncogènes MAFB et MAFA (Boersma-Vreugdenhil et al., 2004; Kalff and Spencer, 2012).

La fréquence des translocations IgH et les trisomies progressent avec la maladie (Kalff and Spencer, 2012). D'autres anomalies, les évènements oncogéniques secondaires, peuvent refléter l'évolution de la maladie.

b. Les évènements oncogéniques secondaires

Ces évènements secondaires incluent des translocations secondaires, des variations du nombre de copies, la perte de l'hétérozygotie, l'acquisition de mutations récurrentes et des modifications épigénétiques.

La délétion du bras court du chromosome 13 est présente chez plus de 50% des patients. Elle est principalement associée à la translocation $t(4;14)$ et à un mauvais pronostic ; tout comme le gain du bras long du chromosome 1 (1q) associé à la translocation (14;16) et observé dans 35% des cas (Morgan et al., 2012). Une perte du bras court du chromosome 1 (1p) peut également être observée chez 30% des patients. La délétion 17p53 est un des facteurs cytogénétiques les plus importants, elle est associée à un très mauvais pronostic (Schmidt-Hieber et al., 2013a). La protéine p53 présente des fonctions anti-tumorales par le biais de différents mécanismes comme l'apoptose, l'inhibition du cycle cellules, la sénescence ou encore les mécanismes de réparation de l'ADN (Bieging et al., 2014). Cette anomalie est rarement observée lors du diagnostic (5% des cas) mais sa fréquence augmente avec la progression tumorale. Les mutations des gènes *RAS*, oncogènes impliqués dans la transformation maligne, sont rarement observées chez les cas de MGUS et pourraient contribuer à la transition MGUS/MM. Certaines voies sont dérégulées telles que la voie « Nuclear Factor Kappa B » (NF-KB), qui joue un rôle important dans l'oncogenèse du MM lorsqu'elle est activée, et la voie du rétinoblastome. L'inactivation de la protéine rétinoblastome impliquée dans le blocage du cycle en phase G1/S peut être réalisée *via* la surexpression de la CCND1 ou par l'inactivation des protéines inhibitrices p16 et p18. Des changements chromosomiques récurrents (translocations, délétions,

duplications, insertions et amplifications) au niveau de la région 8q24 impliquent *MYC*, un oncogène jouant un rôle majeur dans la biologie du MM.

2. L'étude du transcriptome dans le MM

a. Généralités sur les puces à ADN

Les biopuces à ADN (en anglais, « DNA microarrays ») intègrent de nombreuses disciplines telles que la biologie, la nanotechnologie, la chimie des acides nucléiques, l'analyse d'images et la bioinformatique. Elles permettent de mesurer le niveau d'expression de milliers de gènes simultanément (Schena et al., 1995). L'analyse biologique des biopuces repose notamment sur l'étude du transcriptome d'une cellule ou d'un organisme. Elles peuvent être utilisées pour d'autres applications comme le diagnostic, la génomique comparative ou encore l'identification de régions d'ADN régulatrices par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-on-chip).

A partir d'un même gène, plusieurs copies d'ARN messagers peuvent être transcrits à des niveaux différents en fonction de l'activité de la cellule. Le transcriptome reflète donc le niveau d'expression de tous les gènes à un temps t pour une condition physiologique donnée. Il est le reflet instantané de l'activité cellulaire, et peut donc varier d'un type cellulaire à l'autre, au cours du temps ou des différentes phases du cycle cellulaire, en fonction des conditions environnementales, ou en fonction de l'état sain ou pathologique des cellules. L'analyse du transcriptome donne une assez bonne vision du protéome de la cellule, cependant il n'existe pas nécessairement de corrélation entre le niveau d'expression d'un gène et la quantité de protéine produite.

Les puces à ADN reposent sur le principe de la complémentarité des brins de la double hélice d'ADN. Ce sont des supports de verre ou de silicium, de petite taille sur lesquels sont synthétisés directement ou greffés après synthèse des milliers de sondes caractéristiques d'autant de gènes. Les ARN totaux extraits des cellules sont rétrotranscrits en ADN complémentaires puis marqué grâce à une molécule fluorescente, principalement la Cyanine 3 ou la Cyanine 5 qui fluorescent respectivement dans le vert et le rouge. Les cibles ainsi marquées sont mises en contact avec la puce pour procéder à l'hybridation cibles/sondes. Après des lavages successifs, la biopuce est analysée par un scanner à haute résolution afin de déterminer la valeur d'intensité de chaque sonde (*Figure 6*).

Les puces dédiées au suivi de l'expression de gènes sont les plus répandues. Elles visent à comparer l'expression des gènes entre différentes conditions ou au cours du temps. Le procédé permet d'identifier les gènes sur- ou sous-exprimés dans une condition donnée par rapport à une condition

de référence et ainsi d'analyse des profils d'expression de gènes (GEP pour « Gene Expression Profiling »). Un exemple de ce type de puce est la biopuce affymetrix HG-U133 Plus 2.0 qui recouvre l'intégralité du génome codant humain. Elle est composée de plus de 54 000 sondes ciblant plus de 47 000 transcrits codés par environ 38 500 gènes humain déjà caractérisés.

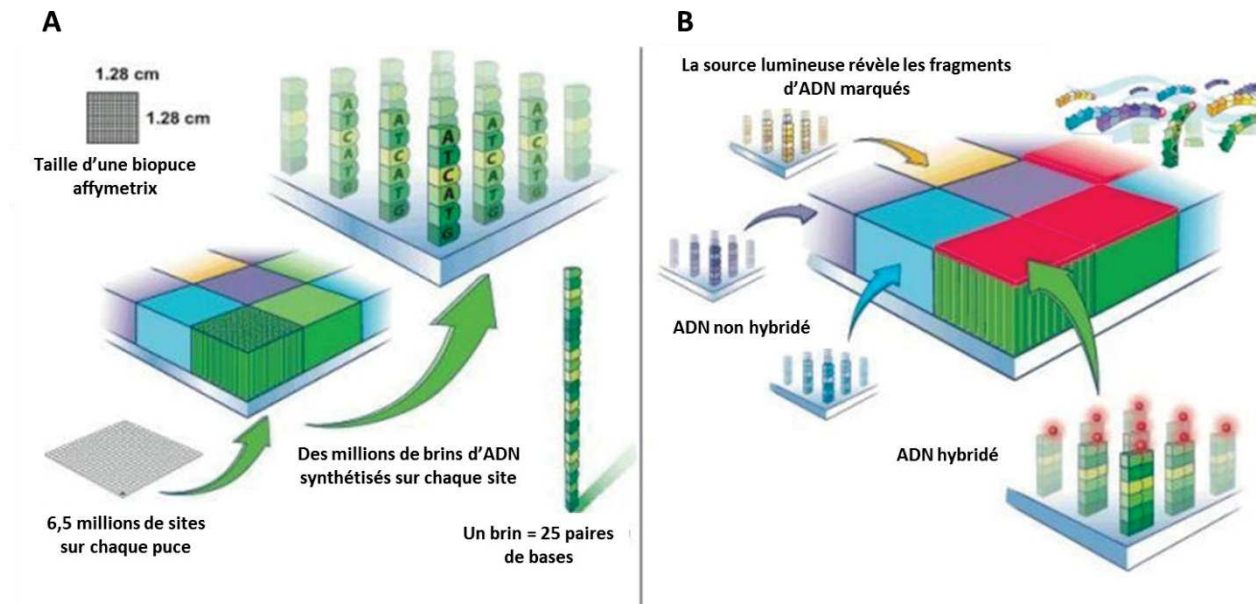


Figure 6 : Schéma du fonctionnement d'une biopuce affymetrix.

(A) Caractéristiques de la biopuce affymetrix et (B) sa détection. (www.affymetrix.com)

b. La classification moléculaire du MM par GEP

En 2006, Zhan et al., se sont appuyés sur des analyses d'expression génique de 414 patients au diagnostic pour proposer une classification moléculaire selon 7 groupes permettant de distinguer les patients à faible ou haut risque : MS (MMSET), MF (MAF), CD-1 et CD-2 (CCND1 et CCND3), HY (MM hyperdyploïdes), LB (« Low Bone Disease ») et PR (« Proliférative ») (Tableau IV).

Le groupe de haut risque MS représente 17% des cas et est caractérisé par la translocation t(4 ;14) et une surexpression des oncogènes codant pour l'histone méthyltransférase MMSET et le récepteur FGFR3. Le groupe MF est caractérisé par une forte expression des oncogènes MAF ou MAFB ainsi que de la cycline D2 et des translocations t(14 ;16) et t(14 ;20). Le groupe PR est aussi un groupe de mauvais pronostic où de nombreux gènes sont surexprimés comme les gènes codant pour les cyclines B1 et B2, la protéine nucléaire Ki-67 ainsi que les gènes du bras long du chromosome 1. De multiples trisomies (chromosomes 3, 5, 7, 9, 11, 15 et 19) caractérisent le group HY qui représente plus de 30% des patients, le risque associé à ce groupe est modéré. Les patients des groupes CD-1 et

CD-2 présentent quant à eux une surexpression des cyclines D1 et D3 et des translocations t(11 ;14) ou t(6 :14).

Tableau IV : Les différents groupes moléculaires.

(Zhou et al., 2009)

| Groupe | % patients | Caractéristiques génétiques | Gènes surexprimés | Risque | Détails |
|---|------------|---|--|----------------|--|
| MS (MMSET) | 17 | t(4;14) | FGFR3, MMSET, CCND2, IL6R | Elevé | Surexpression MMSET associée à FGFR3 (dans 70% des cas), lésions osseuses rares |
| MF (MAF/MAFB) | 6 | t(14;16) ou t(14;20) | MAF ou MAFB, CCND2, IL6R | Elevé / Modéré | Expression élevée de CCND2, lésions osseuses rares, DKK1 faible, signature importante de NF-KB, faible signature des gènes TNF- α |
| CD-1 (CCND1 ou CCND3) | 6 | t(11;14) ou t(6;14) | CCND1 ou CCND3 | Faible | Quelques cas expriment CCND2 en l'absence de CCND1 ou CCND3, expression DKK1 élevée |
| CD-2 (CCND1 ou CCND3) avec expression de CD20 | 12 | t(11;14) ou t(6;14) | CCND1 ou CCND3, CD20, VPREB3 | Faible | Quelques cas expriment CCND2 en l'absence de CCND1 ou CCND3 |
| HY (Hyperdiploïde) | 31 | Trisomies +3, +5, +7, +9, +11, +15, +19 | GNG11, DKK1, FRZB | Modéré | Faible expression ectopique de CCND1, del13 et gain 1q rares, expression élevée des gènes de l'IFN |
| LB (Low Bone disease) | 12 | Trisomies de HY, exception de del13, gain de 1q, rarement gain du chromosome 11 | CCND2, CST6, ARHE, IL6R | Faible | Expression de CCND2, faible taux de DKK1, FRZB, CCR2, HIF1A, SMAD1, expression faible des gènes de l'IFN |
| PR (Prolifération) | 10 | Composé de tous les autres groupes | CCNB1, CCNB2, PCNA, MKI67, TOP2A, TYMS | Elevé | Surexpression des gènes 1q |

c. Scores de risque basés sur le GEP dans le MM

La détermination de profils d'expression génique cherche à identifier une signature moléculaire multigénique dont l'expression combinée peut être caractéristique d'une classe d'échantillons. Les profils d'expression de gènes peuvent prédire la survie des patients (groupe de faible ou haut risque) ou évaluer la réponse thérapeutique (bonne ou mauvaise réponse). C'est dans ce contexte que des

scores de risques basés sur le GEP ont été développés. C'est le cas de deux scores de haut risque, le score GEP70 commercialisé sous le nom de MyPRS (« Myeloma Prognostic Risk Score ») (Alsayed et al., 2009; van Laar et al., 2014; Shaughnessy et al., 2007) et le score IFM15 (Intergroupe Francophone du Myélome) (Decaux et al., 2008) respectivement basés sur l'expression de 70 et 15 gènes (Figure 7). A l'inverse, le score MMSI14 (« MM Survival Index14 ») est basé sur l'expression de 14 gènes de bons pronostics identifiant les patients à faible risque (Chen et al., 2012). Certains scores combinent l'expression de gènes de bons et de mauvais pronostics (Rème et al., 2013a) alors que d'autres scores sont basés sur l'expression de gènes impliqués dans un même processus tel que l'inflammation (Botta et al., 2016), la prolifération (Hose et al., 2011a), ou la réparation de l'ADN (Kassambara et al., 2014). L'utilisation de ces nouveaux outils pronostiques lors du diagnostic ou de la rechute permet d'identifier des patients à haut risque qui pourraient bénéficier d'autres traitements.

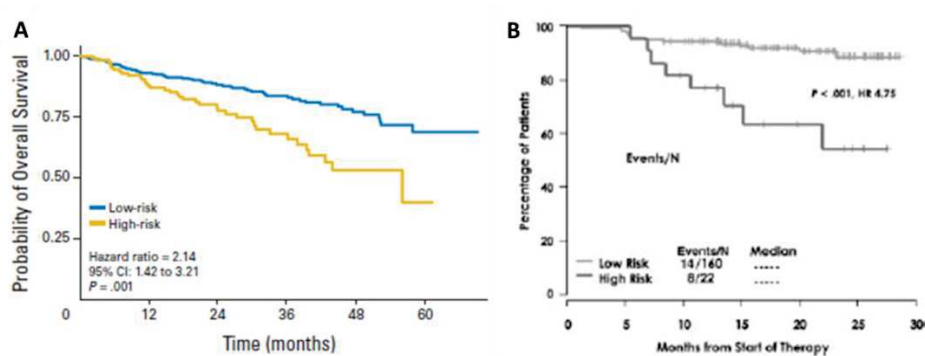


Figure 7 : Les scores GEP70 et IFM15 prédisent la survie globale des patients atteints de MM au diagnostic.

(A) GEP70 sur le sous-ensemble test de la cohorte de l'Arkansas (n = 181 patients). (B) IFM15 sur la totalité de la cohorte de l'Arkansas (n = 582 patients) (Decaux et al., 2008; Shaughnessy et al., 2007).

3. Le séquençage à haut débit dans le MM

Le séquençage à haut débit, ou « Next-Generation Sequencing » (NGS) en anglais est une technique puissante qui permet d'identifier des populations sous-clonales caractérisées par des mutations génétiques récurrentes. Certaines mutations apparaissent précocement dans le développement de la maladie, les mutations clonales. D'autres mutations apparaissent plus tard et sont présentes dans une partie des cellules tumorales, ce sont les mutations sous-clonales (Bolli et al., 2014). Le séquençage du génome ou de l'exome des cellules myélomateuses a permis d'identifier des mutations sur des gènes impliqués dans diverses voies. Les mutations les plus fréquentes touchent les gènes KRAS, NRAS, BRAF, FAM46C, TP53 et DIS3 (Lohr et al., 2014). Ces gènes sont principalement impliqués dans les voies RAS/MAPK (pour « Mitogen-activated protein kinases ») (43%) et NF-KB

(17%) ainsi que dans la réparation de l'ADN (Walker et al., 2015). La dérégulation de cette dernière voie (mutations au niveau des gènes TP53, ATM, ATR et ZNFHX4) est associée à un mauvais pronostic (Walker et al., 2015).

L'ensemble de ces résultats confirme à quel point le MM est une maladie hétérogène et montre la nécessité de caractériser les cellules tumorales afin d'adapter un traitement à chaque patient.

Chapitre II : La cytométrie en flux multiparamétrique

I. Introduction à la CFM

1. Principe de la CFM

La CFM consiste à mesurer ou calculer les propriétés de particules en suspension dans un liquide de gaine lors de leur passage (une à une en théorie) dans une fenêtre de détection (Figure 8).

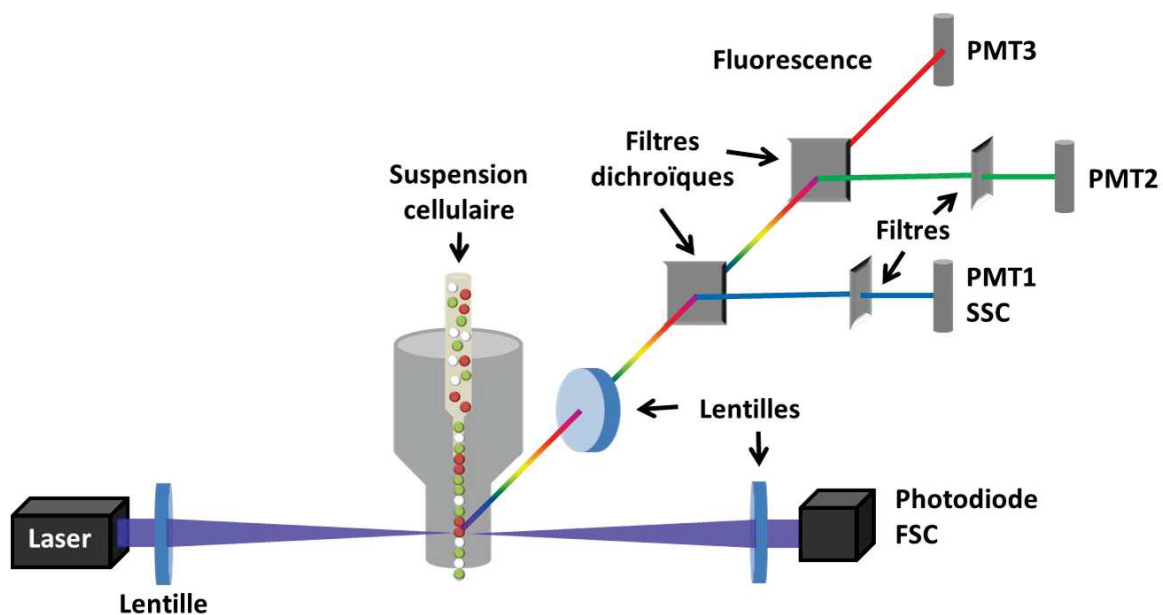


Figure 8 : Représentation schématique d'un exemple de système de CFM.

Il est composé d'une source lumineuse de type laser, une photodiode dans l'axe du laser permettant de mesurer le paramètre FSC et des photomultiplicateurs permettant de mesurer le paramètre SSC et les différentes fluorescences.

En hématologie, ces particules sont des cellules issues d'un échantillon biologique tel que du sang ou de la moelle osseuse. Les cellules sont suspendues dans un liquide et passent les unes à la suite des autres (en théorie) dans une fenêtre de détection. Chaque événement passe devant le faisceau lumineux d'une ou plusieurs sources lumineuses (e.g. laser, diode) et va diffracter de la lumière dans l'axe et à 90°, c'est ce que l'on appelle respectivement les signaux du « Forward Scatter » (FSC) et du « Side Scatter » (SSC). Simultanément, la fluorescence de fluorochromes ou de molécules ayant des propriétés fluorescentes présents à la surface ou à l'intérieur de la cellule peut être mesurée. Les

mesures FSC et SSC permettent de déterminer les caractéristiques physiques et biologiques cellulaires. Le FSC correspond à l'intensité de la lumière diffractée de la source d'excitation dans l'axe (angle $<12^\circ$) et est proportionnelle à la taille de la cellule, alors que le SSC correspond à l'intensité de la lumière diffractée orthogonalement (angle proche de 90°) par rapport à la source lumineuse, elle est représentative de la complexité intracellulaire. Des Ac, couplés à des fluorochromes, vont reconnaître spécifiquement des Ag présents à la surface de la cellule ou des protéines intracytoplasmiques. L'excitation des fluorochromes couplés aux Ac par la source lumineuse va permettre de discriminer les populations d'intérêt. De plus, certaines molécules comme le DAPI ou le 7AAD s'intercalant à l'ADN possèdent des propriétés de fluorescence et sont reconnues de la même façon que les couples Ac/fluorochromes. L'ensemble des données sont récupérées grâce au logiciel d'acquisition du cytomètre et seront ensuite traitées sous forme d'histogrammes ou de graphiques multidimensionnels (souvent deux dimensions) grâce à des logiciels d'analyse (voir Chapitre IV.II.1. Analyse manuelle des résultats).

2. Cas particulier d'un automate d'hématologie

Les automates d'hématologie permettent de réaliser une NFS à partir d'un échantillon biologique (e.g. sang, sérum ou moelle osseuse). Principalement deux techniques de mesure des particules sont intégrées dans ces automates : la variation d'impédance et la diffraction optique. Suivant les automates d'hématologie, les GR, les PLT et les GB sont dénombrés par mesure d'impédance et/ou de diffraction optique.

a. Mesure par variation d'impédance

La mesure par impédance est initialement définie par Wallace Coulter (Coulter et al., 1964), c'est ce que l'on appelle le principe Coulter. L'échantillon de sang total est dilué dans une solution iso-osmotique puis aspiré au travers d'un orifice qui sépare deux chambres, qui contiennent respectivement une électrode positive et une électrode négative. Chaque particule qui traverse l'orifice produit une augmentation de la résistance électrique, appelée impulsion. La hauteur de cette impulsion est proportionnelle au volume de la particule.

Les PLT et les GR sont énumérés sur le même canal, les petites particules sont considérées comme des PLT alors que les grandes particules correspondent à des GR. Certains automates déterminent également le volume des GB par mesure d'impédance dans un autre canal.

b. Mesure par diffraction optique

La mesure optique associe la cytométrie en flux et la diffraction lumineuse. Les particules défilent les unes à la suite des autres dans un capillaire grâce à un système d'hydrofocalisation. Lorsqu'elles traversent un faisceau lumineux (lampe ou laser), elles provoquent l'interruption et la diffraction de ce faisceau. Chaque interruption correspond au passage d'une particule, ce qui permet leur dénombrement. Lorsqu'une lampe est utilisée, l'extinction provoquée par le passage de la particule est mesurée dans l'axe. L'extinction est proportionnelle au volume et au contenu (notamment les granules) de la particule. L'utilisation d'un laser, comme en CFM, permet d'effectuer trois mesures optiques : la diffusion aux petits angles (FSC), la diffusion aux grands angles (SSC) et la fluorescence. En effet, des mesures de fluorescence peuvent être également réalisées dans les automates d'hématologie. Ces mesures d'immunologie sont plus précises mais plus coûteuse. L'automate CELL-DYN Sapphire (Abbott) intègre cette technique pour dénombrer les PLT avec un AcM anti-CD61 dans les situations de fortes thrombopénies. Les automates d'HORIBA Médical, de Sysmex² et d'Abbott³ quantifient les érythroblastes grâce à des molécules fluorescentes qui se lient aux acides nucléiques, respectivement le thiazole orange, le polyméthine et l'iodure de propidium (Tessier-Marteau et al., 2010).

c. Les automates d'hématologie d'HORIBA Médical

Dans la majorité des automates d'HORIBA Médical, le volume des PLT, des GR et des GB est déterminé par mesure de variation d'impédance dans une première fenêtre électrique. Le contenu (ou la granularité) des GB est mesuré(e) par diffraction optique à partir d'une lampe au tungstène dans une seconde fenêtre optique. La mesure dans cette seconde fenêtre est déclenchée suite à la variation d'impédance provoquée par le passage de la particule dans la première fenêtre (

Figure 9). Pour finir, un second banc optique composé d'un laser est utilisé pour compter les réticulocytes et les érythroblastes. Le laser permet de mesurer la fluorescence du thiazole orange. Le déclenchement de cette mesure est également effectué suite au passage d'une particule au niveau du capteur d'impédance.

² <http://www.sysmex.fr/produits/product-list-singleview/xe-2100-571.html>

³ <https://www.corelaboratory.abbott/int/fr/offering/brands/cell-dyn/cell-dyn-sapphire>

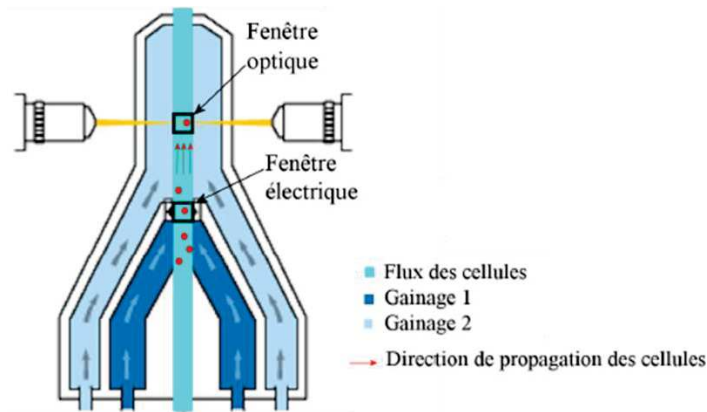


Figure 9 : Schéma d'un système fluide hydrofocalisé.

Les cellules défilent les unes à la suite des autres dans la première fenêtre électrique où la mesure de variation d'impédance est effectuée, ce qui déclenche la mesure de diffraction lumineuse (lampe ou laser) dans la seconde fenêtre optique (Rongeat, 2011).

II. Profil immunophénotypique

1. Généralités

De façon générale, les cellules présentent à leur surface des protéines membranaires qui sont utilisées pour discriminer les différentes populations cellulaires. Chaque protéine de surface, pouvant être reconnue par un AcM, est assignée à un numéro CD (Cluster de différenciation). Les populations cellulaires sont définies en utilisant un « + » ou un « - » lorsque la protéine CD est présente ou absente. Certaines populations sont définies comme ^{hi/bright} (« high » ou « bright », pour fort), ^{int/mid} (« intermediate » ou « middle », pour intermédiaire) ou ^{low/dim} (« low » ou « dim », pour faible) indiquant le niveau global d'expression de la protéine CD. Plus de 300 protéines de surface ont déjà été caractérisées. Grâce à la combinaison de ces protéines CD et à leur expression, l'ensemble des sous-populations leucocytaires peuvent être distinguées, cette technique est appelée immunophénotypage. La *Figure 10* illustre un exemple simple d'immunophénotypage indentifiant 4 populations leucocytaires (CD45+) : les monocytes (CD14+), les lymphocytes B (CD19+), les lymphocytes NK (CD56+) et les lymphocytes T (CD3+). Cette dernière population pouvant être distinguée en deux sous-populations : les lymphocytes T CD4 (CD4+) et les lymphocytes T CD8 (CD8+).

La caractérisation d'une population peut être délicate ; en effet, il existe une grande hétérogénéité immunophénotypique au sein d'une même population cellulaire. C'est le cas des plasmocytes normaux et tumoraux d'un individu à l'autre (variabilité inter échantillons) mais également au sein d'un même individu (variabilité intra échantillon).

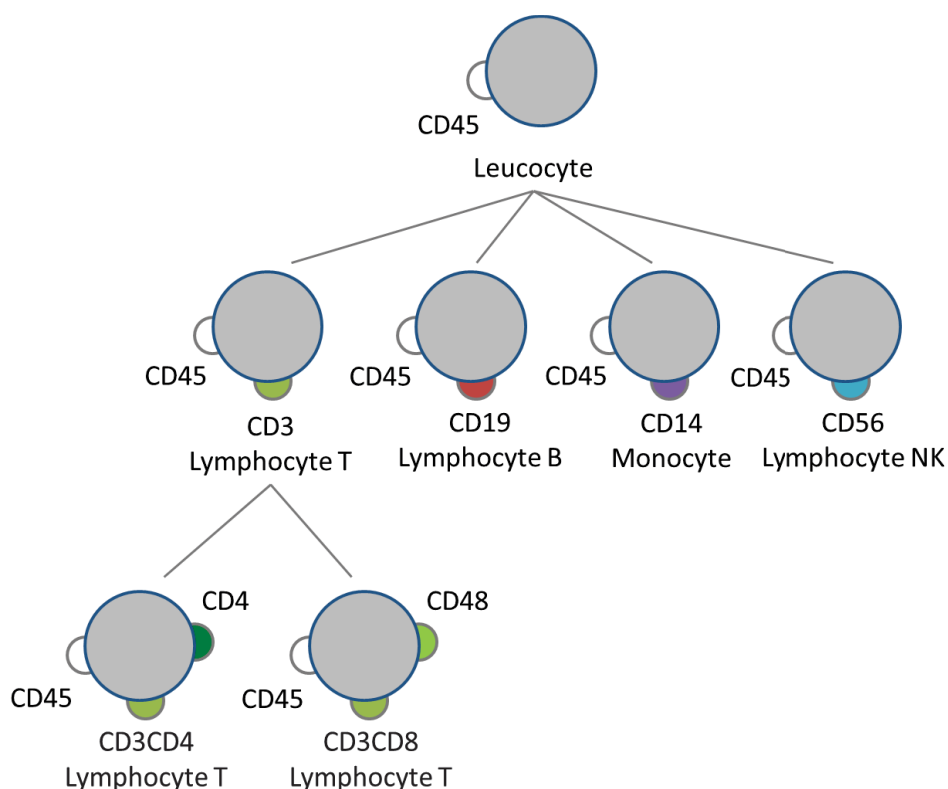


Figure 10 : Exemple d'immunophénotypage de populations leucocytaires.

Les cellules CD45+ sont des leucocytes, parmi elles sont retrouvés les lymphocytes T (CD45+CD3+), les lymphocytes B (CD45+CD19+), les monocytes (CD45+CD14+) et les lymphocytes NK (CD45+CD56+). Les sous-populations de lymphocytes T CD4 (CD4+) et lymphocytes T CD8 (CD8+) se distinguent au sein de la population des lymphocytes T.

2. Caractéristiques phénotypiques des plasmocytes normaux

a. Marqueur leucocytaire

L'Ag CD45 est une tyrosine phosphatase largement exprimé par les cellules hématopoïétiques. Les plasmocytes hautement proliférants présents dans les ganglions et le sang périphérique expriment CD45 très fortement de façon homogène. A l'inverse, les plasmocytes médullaires expriment fortement CD45 mais de façon hétérogène (Robillard et al., 2005). De plus, il a été montré que l'expression de CD45 diminue au cours de la différenciation plasmocytaire (Bataille et al., 2006).

b. Marqueurs des cellules B

Au cours du processus de différenciation, les leucocytes perdent et acquièrent des protéines membranaires. Du stade pro-B au stade Immature B, les lymphocytes B expriment à leur surface les CD10, CD19 et CD20. Au stade mature B, ils perdent le CD10, acquièrent le CD27 mais conservent le

CD19 et le CD20. Ces deux derniers Ag permettent de les différencier au sein d'autres populations leucocytaires. Au stade ultime des lymphocytes B, les plasmocytes perdent progressivement un certain nombre de marqueurs caractéristiques de la lignée B, comme les CD20, CD21, CD22 et CD23, ainsi que le HLA (« Human Leukocyte Antigen ») de classe II (Jourdan et al., 2009). En revanche, les cellules de la lignée plasmocytaires conservent globalement l'expression de CD19, même si son expression est plus faible que dans les cellules B (Ocqueteau et al., 1998). Cependant, il arrive que certaines populations leucocytaires normales n'expriment pas ce marqueur (Bataille et al., 2006). Le marqueur CD27, marqueur des lymphocytes B mémoires, est exprimé par les plasmocytes normaux quel que soit leur stade de maturation. L'Ag CD81, glycoprotéine transmembranaire intervenant dans la signalisation intracellulaire des cellules B, persiste à la surface des plasmocytes alors que le CD40 exprimé sur les plasmablastes disparaît sur les cellules plasmocytaires matures. De plus, la différenciation plasmocytaire s'accompagne de la diminution puis de la perte d'expression en surface de l'Ig qui pourra alors être détectée en intra-cytoplasmique.

c. Marqueurs des plasmocytes

Les deux marqueurs caractéristiques de la lignée plasmocytaire sont le CD38 et le CD138. L'Ag CD38 est une glycoprotéine transmembranaire présentant des fonctions enzymatiques et utilisant comme substrat le NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) ou l'ADP (Adénosine Diphosphate). Cette protéine joue également un rôle dans l'adhésion des cellules à l'endothélium vasculaire et intervient dans des voies d'activation cellulaire. Cet Ag n'est pas spécifique des plasmocytes, il peut être exprimé par les cellules B au cours de la différenciation. L'Ag CD138 appelée syndecan-1 est un protéoglycane de la famille des héparanes sulfates. Au sein des cellules hématopoïétiques, l'expression de CD138 est spécifique des cellules plasmocytaires. Les cellules épithéliales, mésenchymateuses et carcinomateuses l'expriment également. La protéine joue un rôle de récepteur grâce à un long domaine extra-cellulaire qui se lie aux molécules solubles (facteurs de croissance) et insolubles (collagène, fibronectine) et possède des propriétés d'adhésion (cellule-cellule ou cellule-matrice) (O'Connell et al., 2004). CD138 est un marqueur de la différenciation plasmocytaire : au stade plasmablaste, les cellules n'expriment pas CD138 tandis que les précurseurs plasmocytaires, conservant une capacité de prolifération, expriment l'Ag. Au stade ultime de la différenciation plasmocytaire, lorsque les cellules ne prolifèrent plus, elles expriment très fortement CD138 (Jego et al., 1999). Il existe néanmoins une limite à son utilisation en CFM ; en effet, il a été observé une certaine labilité de la protéine quelques heures après le prélèvement médullaire (Lin et al., 2004) rendant son identification impossible. Plus récemment, les marqueurs CD229, CD269 et CD319 ont été proposés en substitution des marqueurs usuels (CD38 et CD138) pour identifier les plasmocytes totaux (Frigyesi et al., 2014; Muccio et al., 2016; Pojero et al., 2016) notamment les

cellules de patients traités avec des AcM anti-CD38 ou anti-CD138. CD229 (SLAMF3/Ly9) et CD319 (SLAMF7/CS1) sont deux membres de la famille SLAM (« Signaling lymphocytic activation molecule 1 »). L'expression de ces deux marqueurs n'est pas spécifique des plasmocytes, CD229 est fortement exprimé sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes tandis que CD319 est exprimé dans les cellules NK et dans les cellules B (Pojero et al., 2016). CD269 (TNFRS17/BCMA) est impliqué dans la régulation des lymphocytes B. C'est un récepteur de BAFF (« B-cell activating factor »), une cytokine de la famille du facteur de nécrose tumorale (« Tumor necrosis factor superfamily ») (Frigyesi et al., 2014).

3. Caractéristiques phénotypiques des plasmocytes myélomateux

Le phénotype normal mais non ubiquitaire des plasmocytes est défini par :

- une forte expression des marqueurs CD38, CD138, CD19, CD27, CD45 et CD81 déjà décrits précédemment ;
- une expression intermédiaire de CD28 et CD200. CD28 est un marqueur lymphocytaire T jouant un rôle essentiel dans les interactions entre les lymphocytes B et T. CD200 est une glycoprotéine transmembranaire membre de la superfamille des Ig et est fortement exprimée dans le système nerveux central, dans les cellules dendritiques et les lymphocytes. Il est impliqué dans un métabolisme immunosuppresseur de l'activité des macrophages, la régulation des lymphocytes T et l'inhibition des lymphocytes T spécialisés dans la reconnaissance des tumeurs (Olteanu et al., 2012). ;
- et une faible voire une absence d'expression des protéines CD20, CD33, CD52, CD56 et CD117 (Flores-Montero et al., 2016a). CD33 est un marqueur de la lignée myélo-monocytaire. CD52 est une protéine chargée négativement qui pourrait être impliquée dans la mobilité cellulaire (Hale and Waldmann, 2000). CD52 est fortement exprimée par les lymphocytes et les monocytes. CD56 (NCAM) est une glycoprotéine de la superfamille des Ig impliquée dans l'adhésion cellule-cellule et est typiquement exprimée par les cellules NK. CD117 (c-kit) est un récepteur de type tyrosine kinase présent sur les CSH qui se lie aux facteurs de croissance.

Les plasmocytes tumoraux présentent des phénotypes différents des plasmocytes normaux. L'expression de certains marqueurs reste identique tandis que l'expression d'autres protéines est modifiée (perte, gain ou variation de l'expression). Comme les plasmocytes normaux, les cellules myélomateuses expriment les marqueurs de la lignée plasmocytaire CD38 et CD138. Il a été observé une perte ou une variation négative de l'expression d'un ou plusieurs marqueurs tels que CD19, CD27, CD38, CD45 et CD81 et/ou un gain ou une variation positive de l'expression d'un ou plusieurs marqueurs comme CD20, CD28, CD33, CD52, CD56, CD117 et CD200 (Alapat et al., 2012; Almeida et

al., 1999; Bataille et al., 2006; Gupta et al., 2009; Jeong et al., 2012; Kumar et al., 2010; Lin et al., 2004; Paiva et al., 2010; Peceliunas et al., 2011; Rawstron et al., 2008; Salama et al., 2015; Seegmiller et al., 2007; Tembhare et al., 2014) (Figure 11).

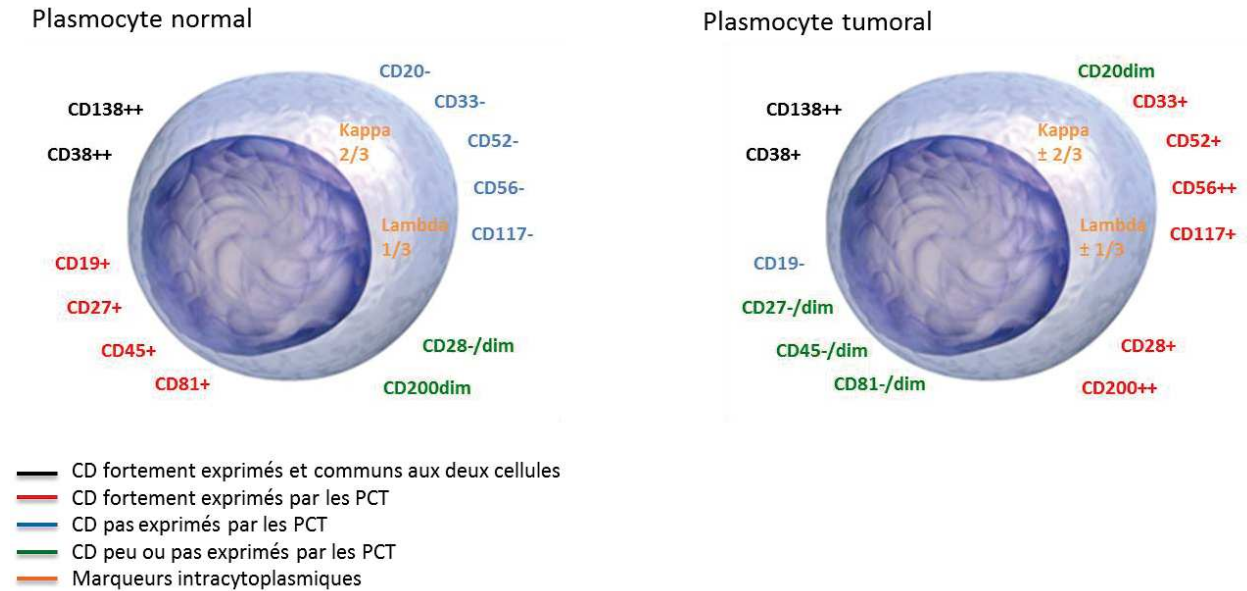


Figure 11 : Profil phénotypique des plasmocytes normaux et tumoraux.

PCT : Plasmocytes Tumoraux.

Aucun marqueur n'a été identifié pour discriminer seul et de façon systématique les plasmocytes tumoraux des plasmocytes normaux et il n'existe pas de profil phénotypique anormal standard. Le clone plasmocytaire peut présenter une variation d'expression d'un ou plusieurs marqueurs, ce profil étant différent d'un patient à un autre. Il est conseillé de suivre l'expression de plusieurs marqueurs, au minimum CD19 et CD56, et de compléter le suivi avec les marqueurs CD20, CD27, CD28 et CD117 (Rawstron et al., 2008) (Tableau V).

L'hétérogénéité immunophénotypique des cellules plasmocytaires normales et tumorales rend l'identification de ces dernières complexe et nécessite de définir un panel de CFM sensible et spécifique.

Tableau V : Liste des CD les plus communément utilisés pour détecter les plasmocytes tumoraux. (Alapat et al., 2012; Almeida et al., 1999; Flores-Montero et al., 2016a; Gupta et al., 2009; Jeong et al., 2012; Lin et al., 2004; Paiva et al., 2010; Rawstron et al., 2008; Salama et al., 2015; Seegmiller et al., 2007; Tembhare et al., 2014)

| Type de profil | Ag | Pourcentage de cas de MM avec un profil aberrant |
|----------------|--------|--|
| Négatif | CD19 | 95-99% |
| | CD27 | 40-50% |
| | CD45 | 40-94% |
| Positif | CD20 | 10-27% |
| | CD28 | 15-45% |
| | CD33 | 6-18% |
| | CD52 | 14-30% |
| | CD56 | 60-88% |
| | CD81 | 55% |
| | CD117 | 28-58% |
| CD200 | 32-70% | |

4. Les sous-clones plasmocytaires

Au moment du diagnostic, certains patients présentent des sous-clones plasmocytaires de profils immunophénotypiques différents (Paíno et al., 2015). L'élimination du sous-clone principal lors du traitement par chimiothérapie libère la niche médullaire et permet aux autres sous-clones de proliférer, provoquant ainsi la rechute des patients. Cela révèle une certaine pression de sélection clonale induite par les traitements (Paíno et al., 2015). Le profil immunophénotypique d'un plasmocyte est également dépendant du stade de différenciation de ce dernier. En effet, comme les plasmocytes normaux, les plasmocytes tumoraux peuvent être présents dans la moelle à différents stades de différenciation. Les trois stades de différenciation, du moins différencié au plus différencié, sont caractérisés par un profil phénotypique $CD19^+CD81^+$, $CD19^+CD81^-$ et $CD19^-CD81^-$ (Paiva et al., 2017). Paiva et al. ont observé qu'un quart des patients présentait une variation du stade de différenciation des sous-clones entre le diagnostic et le suivi de la MRD, notamment vers le stade moins différencié. Les clones $CD19^+CD81^+$ proliférants montrent une résistance au traitement par chimiothérapie et sont associés à un mauvais pronostic (Paiva et al., 2017).

III. Place de la CFM dans la prise en charge du MM

L'identification des populations cellulaires en CFM est réalisée grâce au profil immunophénotypique des cellules qui est défini par l'expression des protéines CD à leur surface. La combinaison des Ac ciblant ces protéines est communément appelée « panel ». Nous avons vu que la CFM permettait

une analyse multiparamétrique de milliers de cellules par seconde, rendant la technique puissante et facilement utilisable tout aussi bien en recherche qu'en clinique. L'identification plasmocytaire, la discrimination entre plasmocytes normaux et tumoraux, la quantification des cellules malignes et leur caractérisation phénotypique en CFM permet de confirmer une suspicion de MM, mais également de réaliser un diagnostic différentiel (MGUS, MM) ainsi que de faire le suivi de la MRD avec une sensibilité plus importante que les méthodes conventionnelles (myélogramme, dosage et électrophorèse des protéines) (Kumar et al., 2010; Paiva et al., 2011; Rawstron et al., 2015). En effet, Rawstron et al. ont montré que trois mois après un traitement par forte dose de chimiothérapie et autogreffe de CSH, 27% des patients présentaient des plasmocytes anormaux détectables en CFM avec un résultat d'immunofixation négatif (Rawstron et al., 2002). Dans l'étude de Caraux et al., il a été observé que deux tiers des patients présentaient des cellules tumorales persistantes sept jours après un traitement d'induction par forte dose de Melphalan (Caux et al., 2012). Ces travaux montrent l'importance de la cytométrie dans la prise en charge du MM. Elle permet de détecter plus tôt la rechute, d'évaluer rapidement l'efficacité d'un traitement et d'anticiper une meilleure prise en charge des patients.

1. Suivi de la MRD en CFM

Avant 2011, la CR était définie par l'absence de protéine monoclonale dans le sang et les urines, et le dénombrement de moins de 5% de plasmocytes dans la moelle osseuse. La CR est alors redéfinie (sCR pour « stringent CR ») afin d'ajouter le dosage des chaînes légères dans le sang et les urines ainsi que la détection des plasmocytes tumoraux en immunohistochimie, en CFM et/ou en PCR (Landgren and Owen, 2016). La CR immunophénotypique (« immunophenotypic CR ») traduite par la présence ou l'absence de MRD est évaluée quantitativement par le pourcentage de plasmocytes tumoraux parmi l'ensemble des cellules nucléées (ou dans certains cas des leucocytes) de la moelle osseuse. L'utilisation d'un panel d'au moins 4 couleurs est nécessaire (Rajkumar et al., 2011). En 2013, la MRD est dite positive quand plus de 50 cellules tumorales sont comptées parmi 500 000 cellules totales (profondeur de 10^{-4}), soit une sensibilité ou une limite de détection (LOD pour « Limit Of Detection ») de 0.01%. En dessous de cette limite, la MRD est dite négative (Rawstron et al., 2013). La transition entre la première et la seconde génération de CFM a permis d'abaisser le seuil de sensibilité de la technique et ainsi d'augmenter la profondeur de détection des cellules tumorales (LOD $<0.001\%/10^{-5}$) (Arroz et al., 2016; Landgren and Rajkumar, 2016). Cette sensibilité requiert l'acquisition d'un minimum de deux millions d'événements (Stetler-Stevenson et al., 2016) et entre trois et cinq millions d'événements pour une acquisition optimale (Mailankody et al., 2015).

2. Valeur pronostique de la MRD

La MRD est un facteur pronostique puissant de la survie sans rechute et de la survie globale des patients atteints de MM. Paiva et al. ont évalué la valeur pronostique du suivi de la MRD en CFM sur une cohorte de patients traités uniformément avec une chimiothérapie d'induction et une autogreffe de CSH (Paiva et al., 2008). En Angleterre, Rawstron et ses collègues ont réalisé une étude similaire sur une cohorte de patients traités par une chimiothérapie intensive ou non-intensive suivi d'une autogreffe de CSH (Rawstron et al., 2013). Dans les deux études, lorsque la MRD est évaluée 100 jours après la greffe, le groupe de patients où la MRD n'est pas détectée présente une survie sans rechute et une survie globale significativement augmentées (Figure 12). Paiva et al. ont montré que la MRD avait également une valeur pronostique après la rechute (Paiva et al., 2014).

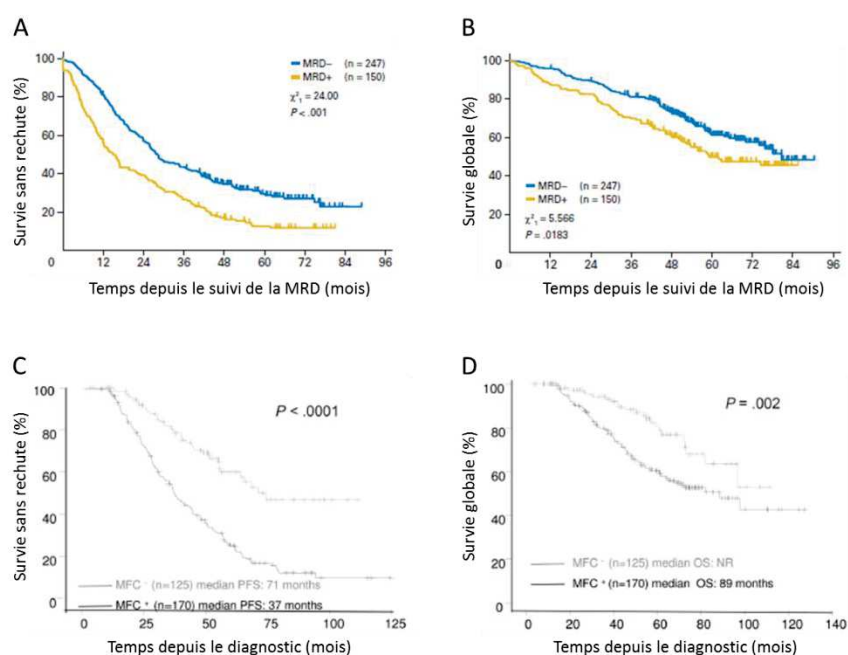


Figure 12 : Valeur pronostique de la MRD.

Courbes de survie sans rechute (A et C) et de survie globale (B et D) de deux cohortes indépendantes de patients atteints de MM (n=397 et n=147) ayant reçu une transplantation de CSH. La MRD est suivie 100 jours après la greffe en CFM. La MRD est négative pour le groupe de bon pronostic, moins de 50 cellules tumorales pour 500 000 cellules normales ont été dénombrées, et inversement pour le groupe de mauvais pronostic. (Paiva et al., 2008; Rawstron et al., 2013)

La puissante valeur pronostique de la MRD permet de prédire la survie des patients lors du suivi de la maladie en CFM juste trois mois après le traitement et d'évaluer rapidement l'efficacité de ce traitement (Landgren and Owen, 2016; de Tute et al., 2016), alors que l'évaluation de nouvelles molécules requiert normalement un suivi entre 5 et 10 ans.

3. Panels de détection des plasmocytes dans le cadre du MM

Le nombre de paramètres mesurés lors d'une acquisition est limité par le nombre de lasers et de détecteurs du cytomètre. Il est important de bien choisir les Ac ciblant les protéines membranaires et/ou intracytoplasmiques des cellules d'intérêt du panel.

a. Première génération de CFM

Il existe un grand nombre de panels de détection des plasmocytes normaux et tumoraux dédiés au diagnostic et au suivi de la MRD. Des panels restreints de quatre à six couleurs suffisent dans la majorité des cas pour confirmer le diagnostic du MM alors que des panels plus complexes sont nécessaires au suivi de la MRD. L'augmentation du nombre de marqueurs utilisés et du nombre de cellules analysées permet respectivement d'accroître la spécificité et la sensibilité de la méthode.

Pour le diagnostic du MM, Morice et al. avaient développé un panel dans un unique tube comprenant les marqueurs CD38 et CD138 pour identifier les plasmocytes totaux, CD19 et CD45 pour détecter le phénotype aberrant des plasmocytes tumoraux, et les chaînes légères kappa et lambda pour observer la clonalité (Morice et al., 2007). De Tute et ses collègues ont utilisé ce même panel pour réaliser le suivi de la MRD de 62 patients. Dans cette étude, la MRD n'est pas détectée dans 29% des cas. Ce résultat pourrait nécessiter une analyse immunophénotypique plus sensible pour confirmer l'absence de faux négatifs (de Tute et al., 2007). En effet, une équipe française a montré que le panel à 6 couleurs utilisé par de Tute et ses collègues était moins sensible qu'un panel à 7 couleurs/8 marqueurs (lambda/(CD28/CD56)/CD138/CD19/kappa/CD45/CD38). Le panel à 7 couleurs a permis la détection de la MRD dans 7 échantillons alors qu'elle était définie négative en utilisant le panel à 6 couleurs (Robillard et al., 2013a). La comparaison entre un autre panel à 6 couleurs (CD56 au lieu de CD45) et un panel à 4 couleurs (CD56/CD38/CD19/CD138) avait déjà montré que l'augmentation du nombre de marqueurs était nécessaire dans certains cas pour détecter la MRD (Marsee et al., 2010). Ces résultats montrent la nécessité d'utiliser un panel complet ciblant le plus de phénotypes différents. Paiva et al. ont montré que le panel à 4 couleurs CD38/CD56/CD19/CD45 utilisé par de nombreuses équipes (Jeong et al., 2012; Kobayashi et al., 2006; Liu et al., 2008) permettait l'identification des cellules tumorales lors du suivi de la MRD dans 90% des cas (Paiva et al., 2008), les marqueurs CD81, CD28, CD117, CD33 et CD20 devant être utilisés dans les autres cas (Paiva et al., 2008; Rawstron et al., 2015). Afin de limiter le nombre de fluorochromes utilisés, l'équipe française du CHU de Nantes a proposé un panel composé d'un « pool d'Ac ». Ce pool permet

de coupler plusieurs Ac au même fluorochrome afin d'augmenter la spécificité du panel tout en conservant un nombre restreint de fluorochromes (Robillard et al., 2013a).

b. Seconde génération de CFM

L'immunphénotypage en CFM présente des intérêts majeurs dans la prise en charge du MM et des hémopathies en général grâce à sa sensibilité, sa simplicité et rapidité. Néanmoins, son utilisation en routine est assez peu répandue et c'est dans le but de standardiser le suivi de la MRD, qu'une nouvelle génération de CFM (en anglais « Next Generation Flow »), plus sensible, a été développée (Kumar et al., 2016). Actuellement, la méthode EuroFlow est la plus répandue et repose sur la combinaison de deux tubes de huit couleurs permettant l'identification des cellules plasmocytaires anormales et le suivi de l'expression des chaînes légères kappa et lambda. Les tubes sont composés d'un groupe de marqueurs communs (CD38, CD138, CD45 et CD19) et de huit autres marqueurs distribués dans le premier tube (CD56, beta-2 microglobuline, kappa et lambda) et le second tube (CD27, CD28, CD81 et CD117) (van Dongen et al., 2012). Cette méthode spécifique et sensible a l'avantage d'être utilisable dans la majorité des centres hospitaliers équipés de cytomètres huit couleurs. Certains centres ont la possibilité d'utiliser un unique tube allant jusqu'à 14 couleurs permettant ainsi la simplification de l'analyse et la diminution du coût du test. Cette nouvelle génération nécessite l'acquisition de plus de 5 millions de cellules pour une sensibilité d'une cellule tumorale pour 10^5 cellules totales (Kumar et al., 2016). De plus, il a été montré qu'il existait une dépendance entre la profondeur de la réponse de la MRD et la survie des patients. Le groupe de patients avec une MRD dite négative ($<10^{-5}$) est associé à une meilleure survie que les groupes de patients avec une MRD dite positive ($<10^{-4}$ et $>10^{-5}$; $>10^{-4}$) (Paiva et al., 2016), montrant ainsi l'avantage de la seconde génération de CFM.

4. Stratégie d'identification des plasmocytes

En cytométrie, l'identification des cellules est systématiquement précédée d'une étape d'élimination des multiplets et des débris cellulaires. Les multiplets sont des événements qui passent au même instant dans la fenêtre de détection et qui peuvent entraîner un biais dans l'analyse des paramètres. Ces événements peuvent être éliminés grâce aux mesures FSC et SSC. En effet, la hauteur du pic de détection d'une cellule est fonction de sa largeur. Lorsque deux ou plusieurs cellules passent en même temps dans la fenêtre, la hauteur du pic est conservée alors que la largeur est augmentée. Les débris cellulaires, de petite taille et de faible complexité, sont éliminés sur la matrice FSC/SSC. Une fois l'ensemble des leucocytes sélectionnés, les plasmocytes sont distingués le plus souvent sur les dimensions CD38, CD45 et CD138. Après sélection des plasmocytes totaux, les plasmocytes tumoraux et normaux sont discriminés grâce aux autres marqueurs d'intérêt (e.g. CD19 ou CD56). Les

différences de niveaux d'expression pour ces marqueurs sont réalisées grâce aux contrôles qui peuvent être internes (Arroz et al., 2016) ou des isotypes.

IV. Autres techniques de détection des plasmocytes tumoraux

Il existe trois techniques principales pour détecter les plasmocytes tumoraux lors du suivi de la maladie résiduelle : la CFM déjà détaillée, la PCR quantitative (PCRq) avec des sondes à allèle spécifique (ASO-PCRq pour « Allele Specific Oligonucleotide PCRq ») et le séquençage nouvelle génération.

1. ASO-PCRq

Cette technique combine l'utilisation de sondes spécifiques d'allèles qui sont complémentaires et capables de s'hybrider à une région d'intérêt, et de la PCRq en temps réel. Dans le cas du MM, les régions variables de l'Ig sont ciblées. Ces régions sont composées de trois types de segments de gènes, les gènes variables, les gènes de diversité et les gènes de jonction (VDJ). Durant la différenciation des lymphocytes B, les segments de gènes VDJ de l'Ig vont être réarrangés et chaque lymphocyte va pouvoir produire une combinaison particulière de ces segments VDJ. En principe, l'ensemble des cellules tumorales proviennent d'un unique clone et produisent des Ig réarrangées identiques. Pour faire le suivi de la maladie résiduelle avec des oligonucléotides spécifiques, il faut dans un premier temps connaître la séquence clonale. Pour cela, au moment du diagnostic, les cellules tumorales sont isolées pour amplifier les régions jonctions par PCR grâce à des amorces consensus (*Figure 13*). Les séquences clonales amplifiées sont ensuite séquencées afin de dessiner les amorces et sondes spécifiques de chaque patient (van der Velden et al., 2003).

Plusieurs groupes ont comparé les techniques d'ASO-PCR et de CFM et ont trouvé une forte et significative corrélation ($r=0,881$, $P<0,001$) entre les deux techniques (Puig et al., 2014). Pour une même quantité d'échantillon, la première technique est dix fois plus sensible que la seconde (Silvennoinen et al., 2014) et peut atteindre une sensibilité entre 10^5 et 5×10^5 (Sarasquete et al., 2005). Le seuil de détection de la MRD en CFM est de 50 cellules tumorales alors que pour la PCR, la détection d'une unique cellule résiduelle suffit (Mailankody et al., 2015; Rawstron et al., 2013). Le temps, le coût et le nombre important d'étapes (tri de cellules, PCR, extraction d'ARN, séquençage, etc...) sont les inconvénients majeurs de la technique de biologie moléculaire. De plus, cette dernière n'est pas applicable à tous les patients. Les principales causes sont le manque de matériel génétique dû à une faible quantité de cellules tumorales de départ, un séquençage infructueux ou des amorces non utilisables. Les groupes espagnols ont observé une application allant de 42% ($n=170$) à 75%

(n=32) sur des patients atteints de MM (Puig et al., 2014; Sarasquete et al., 2005). Il est également important de souligner que cette technique requiert le dessin d'amorces spécifiques d'un clone lors du diagnostic. Après le traitement, il est possible qu'un nouveau clone plasmocytaire prolifère. Dans ce cas, les amorces sont inutilisables et le suivi ne peut être réalisé (van der Velden et al., 2003).

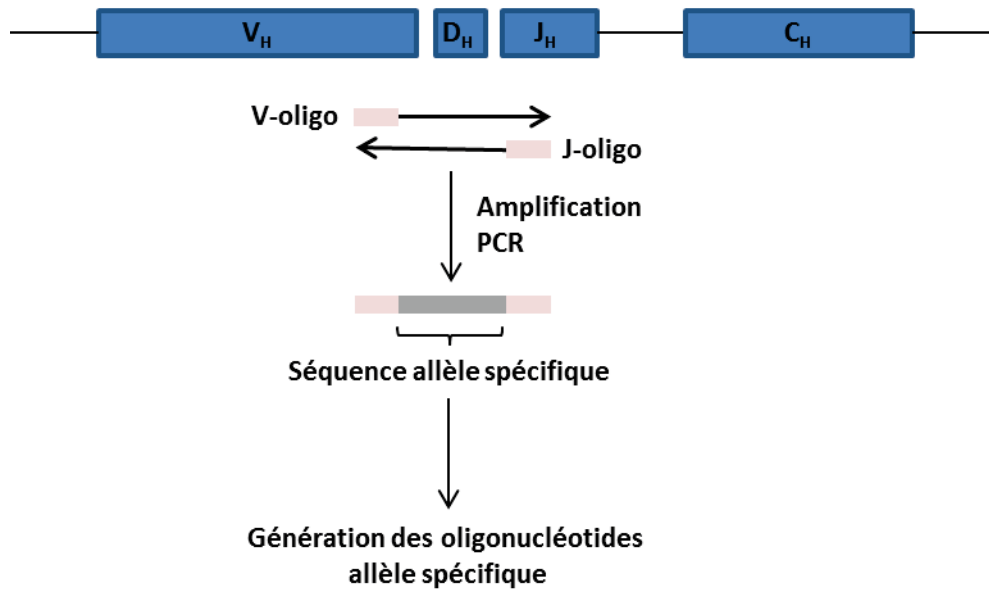


Figure 13 : Technique ASO-PCR et génération d'oligonucléotides spécifiques des régions variables (V_H), de diversité (D_H), de jonction (J_H) et constantes (C_H) d'IgH.

(Billadeau et al., 1991)

2. Séquençage nouvelle génération

Cette technique quantitative combine l'amplification et le séquençage des segments de gènes VDJ des Ig grâce à des amorces consensus. Lors du diagnostic et après isolement de l'ADN génomique, les amorces consensus et universelles permettent l'amplification de l'ensemble des allèles des régions VDJ et DJ de la chaîne lourde de l'Ig (Figure 14). Un clonotype est défini lorsqu'au moins deux séquences (ou « reads » en anglais) identiques sont obtenues. La fréquence de chaque clonotype est déterminée en calculant le nombre de reads de chaque clonotype en fonction du nombre total de reads séquencés. La banque de clonotypes sert de référence pour le suivi de la MRD. Lors de ce suivi, une quantité connue de séquences IgH de référence est ajoutée dans l'échantillon afin de quantifier le nombre de séquences tumorales (Faham et al., 2012).

Le groupe espagnol de Madrid a utilisé cette technique pour suivre la MRD dans une cohorte de 133 patients atteints de MM. Le séquençage a permis la détection d'un clone myélomateux dans 91% des cas (n=121). La comparaison du séquençage nouvelle génération et de la CFM a montré une forte corrélation entre les deux techniques sur 99 patients ($r=0,76$), avec 82 cas où les profils (60 MRD

positif et 22 MRD négatif) sont les mêmes pour les deux techniques, 12 cas où la MRD est positive pour le séquençage mais négatif pour la cytométrie et inversement pour les 5 autres cas (Martinez-Lopez et al., 2014b).

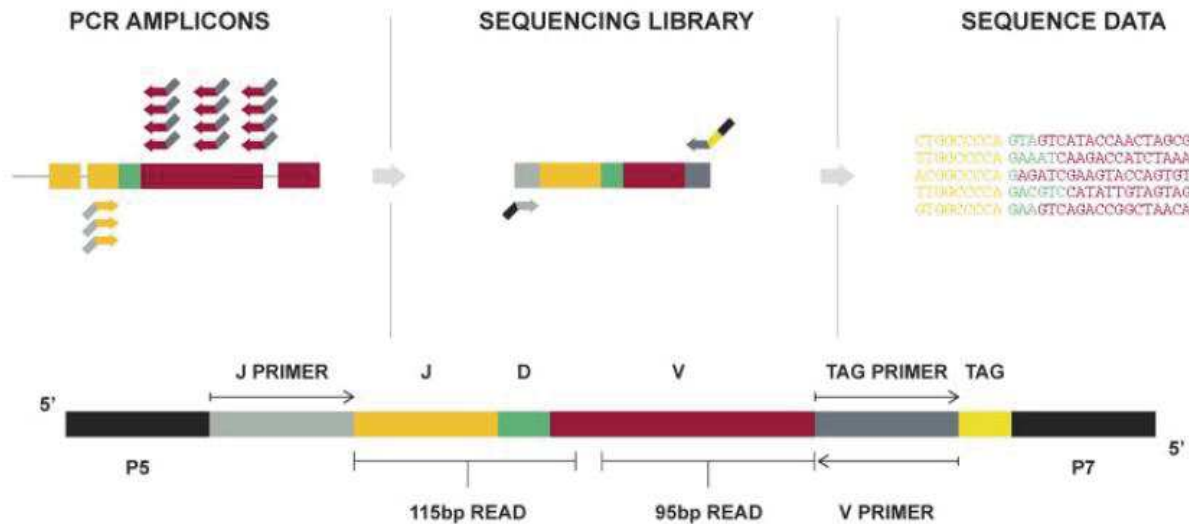


Figure 14 : Schématisation de la méthode de séquençage LymphoSight™ ciblant les régions VDJ d'Ig pour le suivi de la MRD du MM.

(Faham et al., 2012)

Cette technique permet de détecter une cellule tumorale parmi 10^6 cellules normales, ce qui la rend très sensible (Avet-Loiseau et al., 2015). De plus, elle permet de détecter directement l'ADN circulant dans le plasma (Mailankody et al., 2015). Même si le prélèvement de sang est moins invasif que le prélèvement de moelle osseuse, ce dernier reste le prélèvement de référence pour le suivi de la MRD du MM car la concentration d'ADN circulant de cellules tumorales étant très inférieure à la quantité d'ADN des cellules tumorales retrouvées dans la moelle osseuse.

3. Comparaison des techniques de suivi de la MRD du MM

Les techniques moléculaires (séquençage et PCR) sont plus sensibles que la CFM. Pour une sensibilité à peu près équivalente, la cytométrie requiert l'acquisition de plus de deux millions d'événements alors que le séquençage ne requiert que 300 000 cellules. Néanmoins, la CFM est la seule technique applicable à 100% des patients.

Le traitement des résultats de séquençage est analysé automatiquement grâce à des pipelines alors que les résultats de CFM sont majoritairement traités manuellement par un opérateur spécialisé.

Récemment, de nouvelles méthodes ont été développées pour analyser automatiquement les résultats de CFM (voir Chapitre IV.1.3. Automatisation de l'analyse des résultats).

La CFM est une technique rapide et seule son automatisation dans son intégralité (préparation biologique, analyse de l'échantillon et analyse des résultats) est envisageable à l'heure actuelle. Le *Tableau VI* résume la comparaison des trois méthodes.

Tableau VI : Comparaison des techniques de CFM, de l'ASO-PCRq et de séquençages selon différents critères pour le suivi de la MRD du MM.

| Critères | CFM | ASO-PCRq | Séquençage |
|------------------------------|-----------------------|--|--|
| Application | 100% | Entre 45% et 75% | ≈90% |
| Sensibilité | 10^{-4} à 10^{-5} | 10^{-5} | 10^{-6} |
| Types d'échantillons | Cellules vivantes | Echantillon frais de cellules ou ADN stockés | Echantillon frais de cellules ou ADN stockés |
| Vitesse de traitement | Heures | Jours | 1 semaine |

Chapitre III : La préparation biologique

Ce chapitre décrit l'ensemble des étapes techniques de préparation de l'échantillon depuis le prélèvement de l'échantillon (sanguin ou médullaire) jusqu'à son analyse en CFM.

I. Prélèvement d'un échantillon sanguin ou médullaire

La première démarche réalisée auprès du patient lors du diagnostic ou du suivi de la MRD du MM en CFM est le prélèvement sanguin ou médullaire. Pour cette analyse *in vitro*, l'échantillon doit être mélangé avec un anticoagulant afin de rendre le sang ou la moelle prélevé(e) incoagulable. En hématologie, les deux principaux anticoagulants sont l'héparine et l'EDTA. Dans le cadre du diagnostic ou du suivi de la MRD du MM, il est recommandé d'utiliser l'EDTA pour des échantillons analysés dans les 24h ou de l'héparine pour des échantillons analysés dans les 48h (Oldaker et al., 2016). Idéalement, il est conseillé de traiter un échantillon dans les 6h après son prélèvement et de suivre la viabilité des cellules lorsque cette plage est dépassée. Le vieillissement d'un échantillon et donc la perte de viabilité des cellules sont associés au marquage non spécifique des Ac aux cellules mortes et à la diminution de la fréquence des populations fragiles comme les plasmocytes normaux ou tumoraux (Oldaker et al., 2016). De plus, comme nous l'avons vu précédemment, il a été montré que l'expression de CD138 disparaissait de la surface des plasmocytes dans les échantillons vieillis (Jourdan et al., 1998) et que la perte d'expression de CD138 était représentatif des cellules en apoptose (Christensen et al., 2012). Il est intéressant de noter que cette disparition est plus importante dans les échantillons traités à l'héparine comparés aux échantillons traités à l'EDTA (Flores-Montero et al., 2016a).

II. Enrichissement cellulaire

Dans le cadre du suivi de la MRD du MM en CFM, un grand nombre de cellules doit être acquis afin de détecter une population rare, les plasmocytes. Ces derniers ne représentent que 0,5% des leucocytes totaux (lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles et basophiles) dans la moelle. De plus, les GR sont mille fois plus abondants que les leucocytes dans le sang, et représentent 10 à 30% des cellules totales dans la moelle. Le pourcentage de GR dans la moelle varie significativement selon le prélèvement qui peut entraîner une hémodilution plus ou moins importante. Avant l'analyse en CFM, une étape de lyse des GR ou d'enrichissement des GB est donc nécessaire. La CFM nécessitant un échantillon de cellules vivantes, il est important que cette étape

conserve l'intégrité des leucocytes. Il existe de nombreuses méthodes pour réaliser une séparation ou un enrichissement cellulaire d'un composant biologique comme le tri cellulaire magnétique, la séparation par affinité, la lyse cellulaire, la centrifugation ou encore la filtration. Dans ce chapitre, nous ne décrivons que ces trois dernières techniques.

1. Lyse cellulaire

La lyse cellulaire est un processus de destruction ou de dissolution d'une cellule provoqué par l'éclatement de la membrane plasmique, elle peut être physique (congélation-décongélation ou sonication), biologique (bactérie ou virus), enzymatique (protéinase K ou streptolysine O) ou chimique. Dans le cas de l'hémolyse, c'est-à-dire la lyse des GR, nous nous intéresserons aux lyses chimiques. La lyse doit être suffisamment efficace pour lyser la majorité des GR tout en conservant l'intégrité des leucocytes.

a. Caractéristiques de la membrane érythrocytaire

Le processus d'hémolyse chimique implique différents mécanismes au niveau de la membrane érythrocytaire. Pour comprendre les interactions entre les agents de lyse et la membrane il est important de connaître la composition de cette dernière. La membrane érythrocytaire est composée d'une bicouche lipidique et de protéines membranaires impliquées dans diverses fonctions comme le transport de métabolites ou l'ancrage de la membrane au cytosquelette interne (*Figure 15*) (Yawata, 2003).

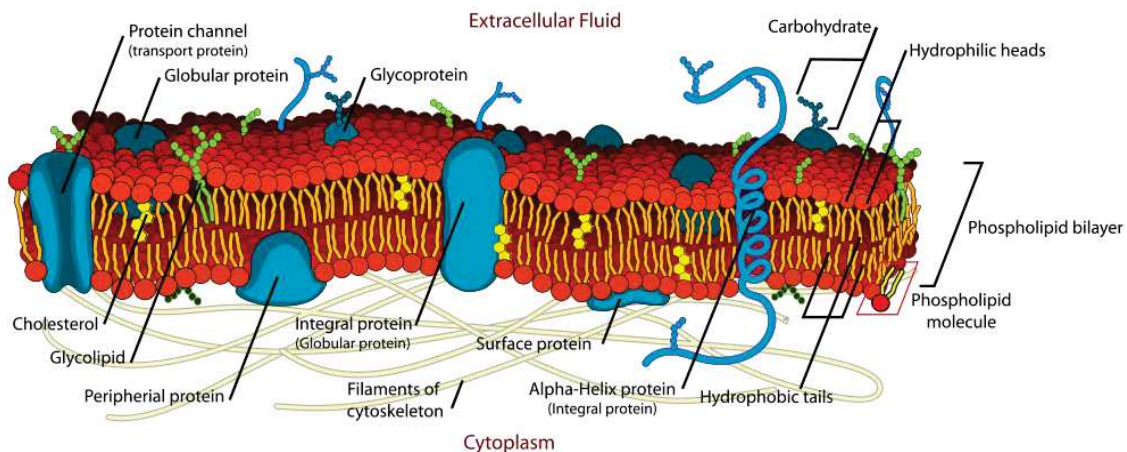


Figure 15 : Composition de la membrane érythrocytaire.

(Yawata, 2003)

Les lipides membranaires sont principalement (i) des phospholipides, qui sont des molécules amphiphiles et insolubles avec une tête polaire dirigée vers l'extérieur de la bicouche et une queue aliphatique dirigée vers l'intérieur de la bicouche, (ii) des lipides neutres représentés majoritairement

par le cholestérol dans les érythrocytes et (iii) des glycolipides. Des transferts de lipides peuvent avoir lieu au sein de la bicouche, entre les feuillet interne et externe, grâce à des enzymes : les flippases, les floppases et les scramblases (Allhusen and Conboy, 2016). Les protéines membranaires quant à elles peuvent être divisées en deux classes. Les protéines intégrales ou transmembranaires, insérées au travers de la bicouche lipidique, sont impliquées dans diverses fonctions comme l'adhésion (ICAM-4) (Lee et al., 2003), la transduction de signaux (récepteurs membranaires) ou le transport de métabolites (Band 3, glycophorine ou aquaporine) (Grant and McConnell, 1974; Reithmeier et al., 2016; Smith et al., 1994), tandis que les protéines périphériques, telles que l'actine, la spectrine ou la protéine 4.1, sont liées indirectement à la surface du feuillet interne *via* une interaction protéine-protéine et constituent le cytosquelette interne (Cohen and Foley, 1984).

b. L'hémolyse par lyse chimique

Il existe principalement deux phénomènes de lyse, (i) la lyse par solubilisation de la membrane érythrocytaire et (ii) la lyse par choc osmotique, cette dernière étant un phénomène plus lent que la solubilisation (Manaargadoo-Catin et al., 2016).

i. Solubilisation de la membrane

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles composées de deux parties de polarité différente, l'une hydrophobe et apolaire et l'autre hydrophile (miscible dans l'eau) et polaire. Les tensioactifs présentant ainsi des similarités avec la membrane cellulaire peuvent interférer avec les interactions protéine-protéine, lipide-lipide et protéine-lipide de cette dernière et provoquer sa désintégration. Lorsque leur concentration est augmentée, les tensioactifs adoptent une configuration appelée micelle favorisant la solubilisation de la membrane (Figure 16) (Schreier et al., 2000).

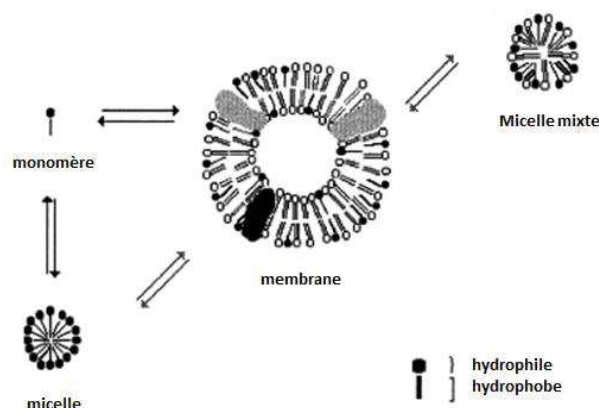


Figure 16 : Schéma du fonctionnement de la solubilisation de la membrane cellulaire par des tensioactifs grâce à la formation de micelles (Schreier et al., 2000)

Ces interactions n'étant pas spécifiques, nous pouvons nous demander pourquoi ce type d'agents de lyse n'a pas le même effet sur les leucocytes. La composition de la membrane leucocytaire est plus riche en protéines (intégrales et périphériques) comparée à celle des GR, augmentant ainsi la conservation de leur morphologie pendant la lyse. L'effet lytique est dépendant de la concentration en tensioactif et du temps d'incubation. Ces deux paramètres doivent être finement ajustés afin de lyser les érythrocytes sans altérer la membrane des leucocytes (*Figure 17*). De plus, l'utilisation de fixateur dans le tampon de lyse permet de protéger la membrane leucocytaire en formant des ponts entre les protéines (« cross-linking ») à l'extérieur et à l'intérieur de la membrane.

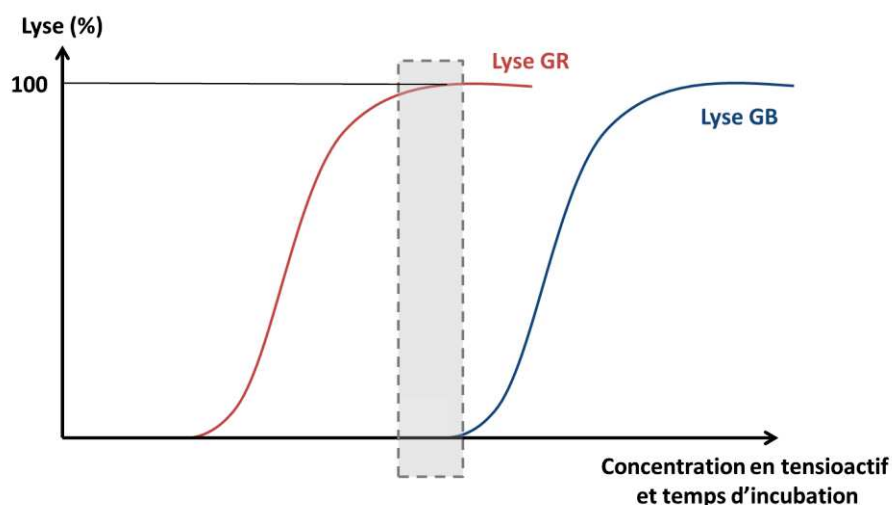


Figure 17 : Représentation schématique de la lyse successive des GR puis des GB en fonction de la concentration en tensioactif et du temps d'incubation.

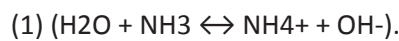
La fenêtre grise représente la concentration optimale en tensioactif permettant de lyser les érythrocytes sans altérer les leucocytes.

Les saponines sont des tensioactifs composés de fragments cycliques ou aromatiques hydrophobes et d'un sucre hydrophile. La lyse des érythrocytes par les saponines est due à la formation de complexes saponine-cholestérol produisant des pores au travers de la membrane (Lorent et al., 2014). Le ratio cholestérol/lipide de la membrane érythrocytaire (0,96) étant bien plus élevé que celui de la membrane leucocytaire (0,52) rend possible la lyse des érythrocytes avant celle des leucocytes (Gottfried, 1967). Les saponines sont utilisées dans les réactifs de lyse HORIBA pour leur efficacité et leur rapidité d'action.

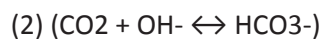
ii. Choc osmotique

La lyse par choc osmotique dans un milieu hypotonique (moins concentré que le milieu intracellulaire) provoque l'entrée d'une grande quantité d'eau dans la cellule puis l'augmentation de la pression intracellulaire et enfin l'éclatement de la cellule.

La lyse au chlorure d'ammonium (NH_4Cl) va provoquer un choc osmotique en modulant l'équilibre ionique de la cellule et provoquer son gonflement, puis son éclatement. Cette lyse est la plus couramment utilisée en CFM du fait de son faible coût et de son efficacité en l'absence de fixateur. La membrane cellulaire est imperméable au NH_4^+ alors que NH_3 peut diffuser au travers de la membrane. Une fois dans la cellule, un équilibre entre NH_3 et NH_4^+ est retrouvé



La protéine transmembranaire Band 3 présente chez les érythrocytes permet les échanges entre Cl^- et HCO_3^- , le Cl^- présent dans le tampon de lyse entre dans la cellule tandis que le HCO_3^- sort de la cellule (Chernyshev et al., 2008). Tant que l'échange entre les deux ions perdure, le HCO_3^- est consommé. L'anhydrase carbonique, une enzyme présente en grande quantité chez les érythrocytes, permet de retrouver cet équilibre



en consommant l' OH^- de la réaction (1). Le net afflux de NH_4Cl dans les érythrocytes augmente ainsi la pression osmotique et provoque l'éclatement des cellules.

Une limitation de cette méthode est la perte de viabilité des leucocytes si le processus de lyse est trop important. En effet, après la lyse des érythrocytes, ces derniers libèrent l'anhydrase carbonique, qui à partir du bicarbonate du tampon de lyse alcalinise la solution ($\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{OH}^-$) et dégrade les leucocytes. La seconde limitation est l'impossibilité de combiner l'utilisation de cette lyse avec le formaldéhyde (fixateur), la combinaison provoquant une réaction ($6\text{HCHO} + 4\text{NH}_3 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4 + 6\text{H}_2\text{O}$) qui acidifie le milieu.

2. Centrifugation

La séparation des cellules sanguines par centrifugation repose sur la formation d'un gradient dépendant des paramètres de la centrifugation elle-même (vitesse, temps) et des caractéristiques des cellules (densité, volume corpusculaire) (*Tableau VII*).

Lors de la centrifugation d'un échantillon de sang total, les leucocytes et les GR, ayant un volume plus important que les PLT, vont s'excentrer plus rapidement. Au début de la centrifugation, la plupart

des leucocytes et des GR sont retrouvés dans la partie inférieure tandis que la partie supérieure contient un plasma riche en PLT. Si la centrifugation est prolongée, les PLT sédimentent également, tandis que les leucocytes remontent mais restent dans la partie inférieure. Les leucocytes se retrouvent alors entourés d'une masse composée de GR qui représente une densité plus élevée que celle des leucocytes. A la fin de la centrifugation, la partie supérieure contient le plasma sans cellule tandis que les GR forment une masse dans la partie inférieure. Les PLT se retrouvent au-dessus de la couche de GR et la majorité des leucocytes se situent juste en dessous des PLT.

Tableau VII : Densité et volume corpusculaire des différentes cellules sanguines.

(<https://www.edqm.eu/en/blood-transfusion-guides-1608.html>)

| | Mean density (g/mL) | Mean corpuscle volume (10 ¹⁵ L) |
|-------------|---------------------|--|
| Plasma | 1.026 | |
| Platelets | 1.058 | 9 |
| Monocytes | 1.062 | 470 |
| Lymphocytes | 1.070 | 230 |
| Neutrophils | 1.082 | 450 |
| Red cells | 1.100 | 87 |

Lorsque le sang est modifié par la lyse des GR, le gradient formé lors de la centrifugation n'est plus le même. Les leucocytes sédimentent très rapidement vers le fond. A la fin de la centrifugation, les leucocytes forment un culot cellulaire au fond, les débris de GR de grande taille se situent juste au-dessus des leucocytes alors que les autres débris de GR ne sédimentent pas et restent en suspension dans le plasma.

Après la centrifugation, la récupération des cellules leucocytaires d'un sang total est complexe et imprécise alors que la centrifugation d'un sang lysé permet de récupérer et de concentrer les cellules d'intérêt en éliminant simplement le surnageant.

3. La filtration

Il existe deux types de filtration, de surface et en profondeur. Lors de la filtration de surface, les particules plus grosses que la taille des pores du filtre ne traversent pas ce dernier et l'obstruent rapidement. La filtration en profondeur est caractérisée par un gradient de taille de pores variable permettant aux cellules d'être capturées dans toute la matrice du filtre. La déplétion des leucocytes grâce à des filtres composés de plusieurs membranes de tailles de pores différentes est une technique de filtration en profondeur.

Il existe quatre mécanismes élémentaires jouant un rôle dans la filtration et la rétention de cellules : le blocage, le pontage, l'interception et l'adhésion (*Figure 18*) (Barbe, 2001). Le mécanisme de blocage intervient quand la particule est plus grande que la taille des pores. Le pontage a lieu lorsque deux ou plusieurs particules s'engagent en même temps dans un pore, c'est le cas avec des concentrations élevées. L'interception est un phénomène mécanique où les particules sont simplement piégées dans le filtre. Lors de l'adhésion, les forces mécaniques comme la gravité ou la pression n'entrent pas en jeu. Ces mécanismes interviennent et sont modulés grâce aux propriétés du filtre (matériau, composition, charge en surface), du composant filtré lui-même (composition, âge), de la technique de filtration (flux, température, amorçage, rinçage) et/ou aux propriétés cellulaires (phagocytose, protéines d'adhésion, rigidité membranaire).

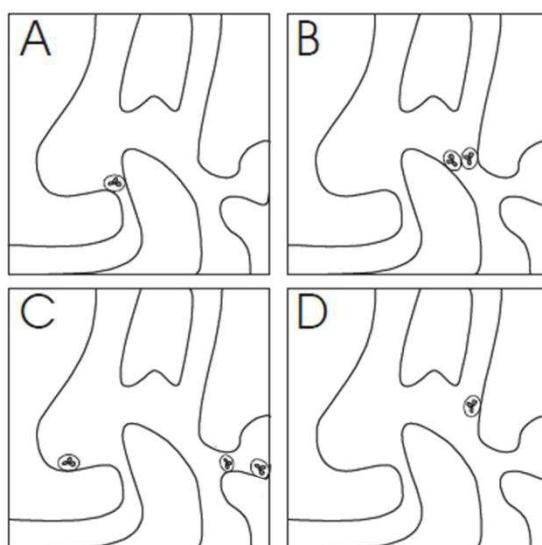


Figure 18 : Représentation schématique des mécanismes élémentaires de la rétention de cellules lors d'une filtration en profondeur.

(A) blocage, (B) pontage, (C) interception et (D) adhésion. (Barbe, 2001)

a. Propriétés impliquées dans la filtration

i. Composition des filtres

Il existe deux types de matériaux, les matériaux dits naturels comme la laine de coton qui a été le premier matériau utilisé (Fleming, 1926) et les matériaux synthétiques utilisés depuis les années 1990. Les principaux matériaux synthétiques formant les membranes filtrantes sont le polytéréphtalate, le polyéthylène, le polyamide, le polypropylène ou l'alcool polyvinylique, la mousse de polyuréthane, la fibre de verre ou de polyester et l'acétate de cellulose. La grande majorité des filtres utilisés pour la déplétion des leucocytes sont en polyamide ou en polyester. Les filtres en polyester sont souvent composés de trois types de couches, des pores rugueux à l'entrée, des pores

fins à la sortie et des pores intermédiaires au milieu. Les cellules complexes et de grande taille comme les granuleux sont capturées au niveau de la première couche tandis que les petites cellules moins complexes telles que les cellules mononuclées sont retrouvées dans la couche inférieure composée de pores étroits (Pietersz et al., 1998).

ii. Propriétés du filtre

Les surfaces rugueuses capturent les leucocytes grâce aux propriétés d'adhésion cellulaire ce qui entraîne des perturbations du flux et de l'efficacité de la filtration (Singh and Kumar, 2009). Les modifications physiques et chimiques du filtre comme la charge globale de sa surface ou l'hydrophobicité peuvent modifier ses performances. Un filtre composé d'une surface chargée positivement provoque l'adhésion des leucocytes chargés négativement. La balance hydrophile/hydrophobe joue un rôle important dans la filtration, si le matériau utilisé est complètement hydrophobe, les GR et les PLT peuvent aussi adhérer à la surface du filtre et boucher rapidement ce dernier, alors que si le matériau est complètement hydrophile, les cellules n'adhèrent pas au filtre et passent facilement au travers de ce dernier (Singh and Kumar, 2009).

iii. Propriétés cellulaires

L'efficacité de la filtration est également dépendante des propriétés des cellules filtrées (rigidité membranaire, protéines d'adhésion, phagocytose). Les cellules composées d'une membrane rigide (naturellement ou par fixation) sont capturées plus facilement. Le degré de déformabilité des leucocytes est environ 1000 fois plus petit que celui des GR (Chien et al., 1983). La température peut également moduler la flexibilité membranaire. En abaissant la température à 4°C, les membranes cellulaires se rigidifient. Les granulocytes et les monocytes quant à eux adhèrent plus facilement aux surfaces à des températures ambiantes (Pietersz et al., 1998). Le phénomène de phagocytose provoque la rétention des granulocytes alors que l'activation des PLT ou des granulocytes par les fibres du filtre peut entraîner la rétention des leucocytes en surface. Enfin les molécules d'adhésion des leucocytes et des PLT, comme les intégrines, les sélectines et les protéines de la superfamille des Ig, participent activement à l'adhésion cellulaire au contact du filtre.

b. Déplétion leucocytaire

En médecine, la filtration est utilisée afin d'éliminer ou de réduire le taux de leucocytes dans les composants sanguins pour éviter certaines complications liées à ces cellules lors de transfusions ou de chirurgies cardio-pulmonaires.

Pendant une transfusion, les leucocytes peuvent être responsables de différents effets comme les réactions fébriles non hémolytiques, d'allo-immunisation ou d'immunomodulation. De plus, les leucocytes sont des vecteurs de certains virus, bactéries (Williamson, 2000) ou protéines prions comme celle impliquée dans la maladie de Creutzfeld-Jakob (Lacroux et al., 2012). Certains effets ou réponses sont populations leucocytaires dépendants. Les neutrophiles sont impliqués dans les réponses inflammatoires (Matheis et al., 2001) et les granulocytes jouent un rôle dans les réactions fébriles non hémolytiques et sont connus pour être un vecteur du cytomégalovirus (Pietersz et al., 1998). Afin de réduire ces effets, le concile européen recommande une réduction leucocytaire des composants sanguins transfusés (moins de 10^6 leucocytes par composant)⁴.

Les filtres utilisés dans ce contexte sont souvent constitués de fibres de polyester non tissées avec une surface modifiée afin d'activer l'adhésion des leucocytes. La plupart des filtres retrouvés sur le marché sont commercialisés par Pall Corporation (Port Washington, New York). En chirurgie cardiaque, de nombreux groupes ont testé des filtres de 30-40 μ m afin de réduire le nombre de leucocytes pendant la circulation extracorporelle (Matheis et al., 2001; Morris, 2001; Singh and Kumar, 2009; de Vries et al., 2003). Deux méthodes de filtration peuvent être utilisées avec ces filtres, par pression ou par gravité. Selon la méthode, le flux diffère et module l'efficacité de la filtration. Un flux important et une forte pression exercée sur le filtre entraînent des dommages au niveau des membranes cellulaires. Dans ce cas, même si 99% des leucocytes sont retenus, certains facteurs solubles comme des enzymes ou des cytokines peuvent être libérés et entraîner une réponse inflammatoire (Matheis et al., 2001).

Ces filtres ont une efficacité pouvant aller jusqu'à 99,9% quand ils sont utilisés sur des composants sanguins, cependant cette efficacité diminue sur du sang total. Lors de chirurgies cardiaques avec circulation extracorporelle, une réduction allant jusqu'à 70% des leucocytes a été observée (Matheis et al., 2001).

c. Enrichissement leucocytaire

Nous avons vu précédemment que l'analyse d'une population rare nécessite l'enrichissement de cette même population. Dans les cas d'analyses de cellules tumorales circulantes de divers cancers (Coumans et al., 2013a) ou de cellules tumorales persistantes lors de la maladie résiduelle d'hémopathies, la population d'intérêt ne représente que 0,01% des cellules totales de l'échantillon.

Le principe de l'enrichissement leucocytaire par la méthode de filtration repose sur le passage d'un composé sanguin à travers un filtre qui capture les cellules d'intérêt (e.g. leucocytes) et qui laisse

⁴ www.edqm.eu

passer les autres populations (e.g. GR ou PLT). Une fois le composé entièrement filtré et les leucocytes capturés, une solution d'élution (« back-flush ») est renvoyée dans le sens inverse de la filtration et les leucocytes sont récupérés (Figure 19). Le taux de récupération des leucocytes dépend de deux types de paramètres : les critères de filtration favorisant la capture des cellules d'intérêt au-dessus du filtre et les critères d'élution permettant le décrochage des cellules dans une solution finale enrichie en leucocytes. Les critères de filtration sont principalement ceux introduits dans le paragraphe précédent (matériau du filtre, taille des pores, charge, hydrophobicité, pression). Les critères d'élution concernent en grande partie la solution qui va permettre de récupérer la population d'intérêt mais aussi la vitesse et la pression. Les solutions d'élution sont souvent des solutions phosphates salines (PBS pour « phosphate-buffered saline ») avec des concentrations en sels proches de celles du corps humain (solution isotonique) permettant aux cellules de rester viables. Au tampon salin peuvent être ajoutés d'autres composés comme du dextrane (polymère ramifié du dextrose) ou du sucrose permettant d'augmenter la viabilité des cellules mais aussi la viscosité de la solution afin de décrocher plus facilement les cellules (Meyer et al., 2005; Wagner et al., 2006).

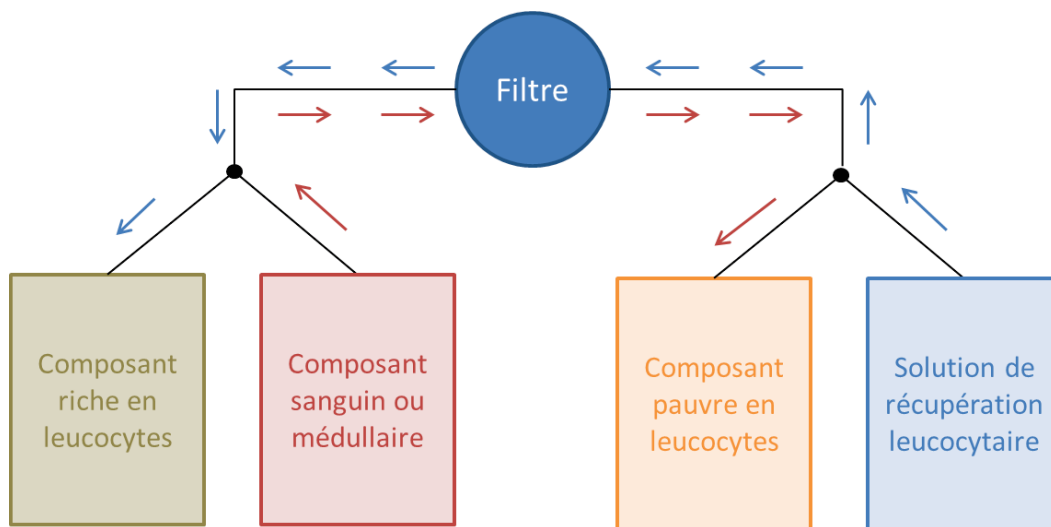


Figure 19 : Schéma de l'enrichissement leucocytaire par filtration à partir d'un composé sanguin ou médullaire.

Les flèches rouges indiquent le sens de la filtration (première étape) et les flèches bleues indiquent le sens de l'élution avec la solution de récupération leucocytaire (seconde étape).

L'enrichissement des leucocytes par la méthode de filtration a débuté avec les filtres qui étaient jusqu'alors utilisés pour leur déplétion dans les composants sanguins. Les groupes de Longley et Meyer ont testé l'efficacité de la récupération leucocytaire avec un filtre Leukotrap (Pall Corporation) sur du sang total et ont évalué une viabilité cellulaire de plus de 95% (Longley and Stewart, 1989;

Meyer et al., 2005). L'équipe de Meyer a également testé des filtres d'autres firmes, le Compoflex T3908 (Fresenius Hemocare), le Leukoflex LST-1 (MacoPharma) et l'Optipure RZ 2000 (Baxter). Selon les filtres utilisés, la proportion des sous-populations leucocytaires (lymphocytes, monocytes et granulocytes) peut être modifiée. Le Leukoflex est le filtre qui conserve la meilleure proportion cellulaire. Le Leukotrap récupère plus de granulocytes au détriment des lymphocytes, contrairement aux deux derniers filtres qui sont plus adaptés à la récupération de petits leucocytes comme les lymphocytes (Meyer et al., 2005).

III. Immunophénotypage

Une fois les leucocytes récupérés et les érythrocytes éliminés, l'immunophénotypage des cellules peut être réalisé. C'est une technique de CFM qui permet la détection de sous-types cellulaires au sein d'une population hétérogène grâce à l'immunomarquage. Cette technique vise à identifier une cellule grâce à un Ac couplé à un fluorochrome. Pour identifier une sous-population leucocytaire, il est préférable de combiner plusieurs AcM révélés par différents fluorochromes. Il existe deux types d'Ac, les Ac primaires directement couplés à un fluorochrome et spécifiques de la protéine cible et les Ac secondaires, utilisés dans le cadre de marquages indirects avec un Ac primaire non couplé. Les AcM peuvent cibler des protéines membranaires, appelées aussi protéines de surface, ou des protéines intracellulaires. Suivant les protéines ciblées, les protocoles ainsi que les réactifs varient. Le marquage des protéines de surface ne nécessite pas d'étape supplémentaire lorsque que les échantillons sont analysés rapidement. Dans le cas où les échantillons sont analysés ultérieurement, les cellules marquées doivent être fixées afin de les conserver. Lorsque des protéines intracellulaires sont ciblées, les cellules doivent être fixées et perméabilisées pour permettre aux Ac couplés à leur fluorochrome de pénétrer dans la cellule. Il n'existe pas de méthode standard pour réaliser ce type de marquage, le choix des réactifs de fixation et perméabilisation ainsi que l'ordre des étapes varient d'un protocole à l'autre.

1. Fixation

Cette étape n'est pas obligatoire lorsqu'un simple marquage de protéines de surface est réalisé sur un échantillon et que ce dernier est analysé rapidement (Rawstron et al., 2002). La fixation permet de conserver les cellules dans un état donné durant des heures, des jours voire des mois et ainsi d'analyser l'échantillon à posteriori. Lorsqu'un marquage de protéines intracytoplasmiques est nécessaire, les cellules doivent être fixées afin de les perméabiliser pour permettre aux Ac d'atteindre leur cible.

Il existe deux types de fixateurs, les alcools et les aldéhydes. Les alcools, principalement l'éthanol et le méthanol, dénaturent les protéines et dissolvent les lipides créant ainsi de larges trous dans la membrane cellulaire. En CFM, les aldéhydes sont utilisés pour fixer les cellules en créant des ponts entre les résidus lysine. De ce fait, la structure de la plupart des protéines reste intacte. Sont retrouvés principalement le glutaraldéhyde ; le formaldéhyde, dérivé du paraformaldéhyde (PFA) par chauffage ; et le formaline, composé de 35% de formaldéhyde et de 10% de méthanol pour stabiliser la solution et éviter la production d'acides (Vives-Rego et al., 2000). Le glutaraldéhyde augmente la formation de ponts entre les protéines (« cross-linking ») comparé au formaldéhyde, ce qui rend la reconnaissance des Ac pour leur cible plus difficile. Il augmente également l'autofluorescence cellulaire, le formaldéhyde et le formaline étant ainsi de meilleurs candidats pour la CFM.

La fixation présente certains désavantages : (i) Les marquages sur des cellules viables pour étudier les potentiels membranaires et les activités enzymatiques ne peuvent pas être appliqués aux cellules fixées c'est pourquoi ce type de marquage est réalisé avant la fixation ; (ii) les cellules fixées ne peuvent pas être triées pour de la mise en culture ; (iii) l'intensité de fluorescence après l'association de fluorochrome avec certaines molécules cibles peut être plus faible par rapport à celle des cellules non fixées ; (iv) la fixation peut entraîner des changements de conformations des protéines et ainsi causer des difficultés d'analyse (Vives-Rego et al., 2000).

2. Perméabilisation

Lorsqu'un marquage de protéines intracytoplasmiques est nécessaire, les trous créés par le fixateur ne suffisent pas à la pénétration des Ac couplés à leur fluorochrome. Pour une pénétration optimale, un perméabilisant est utilisé pour créer de larges trous dans la membrane (Vives-Rego et al., 2000). Les perméabilisants utilisés en CFM peuvent être de nature détergente (alcools, saponine, Triton X-100, Tween-20, Tergitol Type NP40) ou enzymatique (protéinase K, streptolysine O) (Amidzadeh et al., 2014). Comme le fixateur, le choix du perméabilisant est important. En effet, des effets non souhaités peuvent être provoqués tels que des dommages voire la lyse cellulaire si la concentration est trop forte, une altération de la diffusion des Ac à travers la membrane si la concentration est trop faible, une augmentation de l'autofluorescence des cellules ainsi que le marquage de sites non spécifiques (Zelnickova et al., 2007).

Dans la majorité des études, le marquage des protéines de surface est réalisé avant la fixation et la perméabilisation (Mathis et al., 2014; Tembhare et al., 2014; de Tute et al., 2007) mais certains auteurs réalisent le marquage des protéines de surface et intracytoplasmiques simultanément pendant la perméabilisation (Mascher et al., 1999; Perez et al., 2004). Dans ce cas de figure, un cocktail d'Ac peut être utilisé afin de faciliter et de standardiser les manipulations tout en limitant les

erreurs de pipetage (Oldaker et al., 2016). Il est important d'adapter son protocole d'immunophénotypage en fonction des Ag ciblés et de vérifier que l'ensemble des étapes n'altère pas la conformation de ces Ag.

Chapitre IV : L'analyse de données biologiques

I. Analyse de résultats de biopuce

L'analyse des résultats de biopuces à ADN est réalisée en plusieurs étapes qui sont la lecture des signaux d'hybridation à l'aide d'un scanner, l'extraction des données numériques, la normalisation des données extraites et enfin l'analyse de ces données. Les deux premières étapes sont généralement réalisées grâce aux matériels et aux outils fournis par le fabricant. Concernant les deux dernières étapes, de nombreuses approches ont été développées pour les réaliser.

1. Normalisation des données

De nombreux biais techniques peuvent être introduits lors des différentes étapes de l'expérience. Ces biais peuvent provoquer des variations affectant les intensités mesurées. La normalisation permet de quantifier et de soustraire ces variations afin de mieux interpréter les résultats des biopuces. Il existe deux types d'approches de normalisation : linéaires et non linéaires. Les approches linéaires consistent à trouver une constante de proportionnalité entre les données tandis que les approches non linéaires sont plus générales et considérées plus puissantes. Différentes méthodes de normalisation ont été implémentées dans des packages R du projet Bioconductor tels que `marray` (Wang et al., 2002), `limma` (Ritchie et al., 2015) ou `MAS5` (Hubbell et al., 2002).

2. Méthodes d'analyse des données

De nombreuses approches d'analyse des données de biopuces existent telles que l'analyse différentielle de l'expression des gènes ou les méthodes de classification supervisées ou non supervisées.

a. Analyse différentielle de l'expression de gènes

L'intérêt de l'analyse de l'expression différentielle est d'identifier les gènes s'exprimant entre différentes conditions biologiques ou entre un échantillon de référence et un échantillon testé. De nombreuses méthodes statistiques permettent ainsi d'identifier les gènes sur- ou sous-exprimés. L'une des méthodes les plus connues est celle du « k-fold » basée sur la valeur du ratio entre les niveaux d'expression relatifs à la condition de référence et ceux des différentes conditions testées (DeRisi et al., 1997). Un gène est considéré comme exprimé de façon différentielle si son ratio « R »

(appelé en anglais « fold change ») est supérieur à la valeur seuil « k » choisie. La détermination de k reste la difficulté majeure, elle dépend du niveau d'expression recherché, de la variabilité d'expression de chaque gène et de la complexité de l'échantillon. Dans de nombreuses expériences de biopuces, le niveau d'expression d'un gène est considéré significativement différent si k est égal à 2 (soit $R \geq 2$) pour un gène surexprimé et significativement réprimé si k est égal à 0,5 (soit $R \leq 0,5$). Cette méthode est la plus couramment utilisée pour l'analyse de données de biopuces.

Des approches statistiques sont utilisées en parallèles. Ces approches sont soit paramétriques (test de Student) et applicables sur des données suivant une distribution normale, soit non paramétriques (test de Wilcoxon ou de Mann & Withney), ces dernières étant moins sensibles au mode de distribution des données.

Un test de correction multiple doit être ensuite appliqué pour supprimer les faux positifs. Par exemple, avec une puce de 54 000 sondes et un taux d'erreur de 5%, le nombre de faux positif est de 2 500. Différentes approches peuvent être utilisées comme celle de Bonferroni-Holm (Holm, 1979) ou de Benjamini Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995).

b. Classification

Les méthodes de classification vont permettre de regrouper les gènes ou les échantillons en fonction de leurs profils d'expression. Les approches de classification consistent à répartir un ensemble d'objets en plusieurs groupes en fonction de leurs similarités. Cette répartition minimise la variabilité intra-groupe et maximise les distances inter-groupes. Les résultats d'intensité sont organisés dans une matrice de niveau d'expression dont chaque ligne correspond à un gène et chaque colonne représente un échantillon donné. Il existe deux types de classification : supervisée et non supervisée.

Les approches de classification supervisée, ou de prédiction de classes, comprennent une phase d'apprentissage permettant d'établir des règles de classification à partir d'un jeu de données dont la classification est connue. Ces règles sont ensuite généralisées et utilisées pour prédire la classification de nouveaux jeux de données. Parmi ces approches, les techniques de machines à vecteurs de support et des k plus proches voisins peuvent être citées.

Les approches de classification non supervisée sont des techniques de regroupement (« clustering ») qui séparent les données en groupes distincts sans connaissance au préalable des classes existantes. La classification hiérarchique consiste à calculer une matrice de similarité entre les gènes (Eisen et al., 1998; Spellman et al., 1998). Un arbre est construit pour représenter une hiérarchie de groupes de gènes où la liaison entre deux gènes (feuilles) correspond à un nœud. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle nécessite une mémoire importante lors du traitement de grands jeux de

données. Une autre méthode non supervisée est celle des *k*-means qui consiste à calculer un point central (centre de gravité) pour chaque groupe ou cluster et d'attribuer chaque gène au cluster le plus proche (Ben-Dor et al., 1999). Les avantages de cette méthode sont sa simplicité, sa rapidité et sa capacité à traiter des jeux de données importants mais elle nécessite de prédéterminer le nombre de classes.

3. Logiciels d'analyse des données de biopuces

Il existe divers logiciels d'analyse de données de biopuces. Certains sont des outils Java tels que TM4 (Saeed et al., 2006) ou Genesis (Sturn et al., 2002), d'autres sont des packages R comme SAM (« Significance Analysis of Microarrays ») (Tusher et al., 2001). La plupart de ces logiciels sont librement accessibles en ligne.

SAM est distribué par l'Université de Stanford sous forme d'un package R et d'une macro Excel (<http://statweb.stanford.edu/~tibs/SAM/>). Cet outil statistique permet de vérifier si les différences d'expression génique sont statistiquement significatives. La méthode SAM permet de trouver les gènes exprimés de façon différente entre plusieurs conditions en se basant sur un t-test modifié et des permutations aléatoires des données d'expression. Un score est attribué à chaque gène sur la base du changement de son niveau d'expression par rapport à l'écart type des mesures répétées de ce gène. Les différences d'expression des gènes ayant des scores supérieurs à un seuil donné sont considérées comme potentiellement significatives.

II. Analyse de résultats de CFM

1. Analyse manuelle des résultats

L'analyse des résultats de CFM est généralement réalisée par un fenêtrage manuel (en anglais, « gating »). Le terme de fenêtrage correspond à l'extraction de régions dans des projections successives en une ou deux dimensions. Ces régions correspondent à des groupes homogènes de cellules appelés populations. Les fenêtrages peuvent être délimités par des intervalles sur un histogramme, des rectangles, des polygones, des cadrans ou des ellipses sur des graphes en deux dimensions (*Figure 20*). Le fenêtrage manuel requiert une connaissance approfondie de la biologie cellulaire, de la technologie même de la CFM ainsi que de l'inspection visuelle des résultats.

Il existe divers logiciels ou packages R dédiés à l'analyse manuelle des résultats de CFM :

- Les logiciels commercialisés par les fabricants de cytomètres tels que Kaluza® (Beckman Coulter) ou FACSDIVA™ (Becton Dickinson) ;

- Les autres logiciels commerciaux, les plus couramment utilisés étant FlowJo® (www.flowjo.com) et Infinicyt™ (<http://www.infinicyt.com>) ;
- Et les packages R comme FlowCore (Hahne et al., 2009) ou flowViz (Sarkar et al., 2008) qui permettent le traitement et la visualisation des données de CFM.

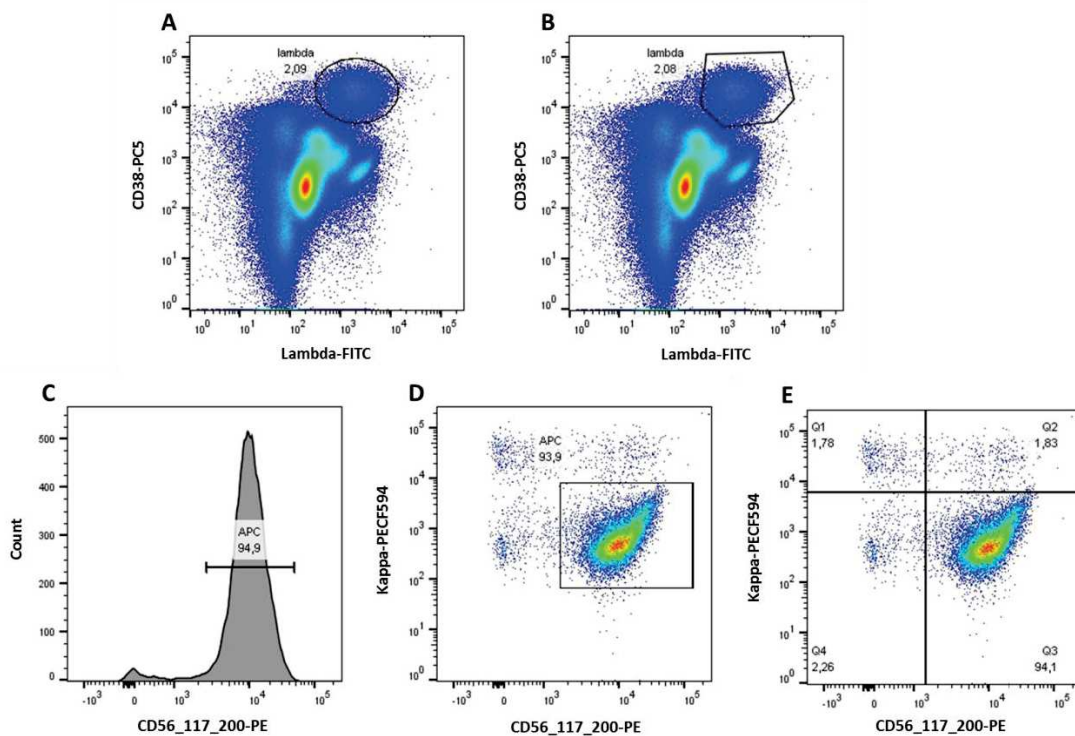


Figure 20 : Différents fenêtrages possibles.

Les plasmocytes lambda ($\text{lambda}+\text{CD38}+$) sont sélectionnés avec une ellipse (A) ou un polygone (B) sur le graphe à deux dimensions $\text{lambda}/\text{CD38}$. Les plasmocytes tumoraux ($\text{CD56}/\text{CD117}/\text{CD200}+$) peuvent être sélectionnés sur une dimension ($\text{pool}+$) grâce à des intervalles sur l'histogramme (C) ou sur un graphe à deux dimensions ($\text{pool}+/\text{kappa}$) grâce à un fenêtrage rectangulaire (D) ou à l'aide d'un cadran, ici en Q3 (E).

2. Inconvénients du fenêtrage manuel

Il est clair que l'analyse manuelle est laborieuse et subjective (Lugli et al., 2010), ces problèmes étant accentués par l'utilisation d'un grand nombre de paramètres augmentant ainsi le nombre de projections à analyser. De plus, certaines populations ne peuvent pas être sélectionnées sur deux dimensions et sont identifiables uniquement dans un espace multidimensionnel. Pour finir, le temps nécessaire et la source importante d'erreurs générées font de l'analyse manuelle une méthode non reproductible et non standardisée (Bashashati and Brinkman, 2009). C'est pour pallier ces limitations

que l'analyse automatique des données de CFM est de plus en plus répandue. De nombreuses contraintes rendent l'automatisation de l'analyse des résultats complexe, notamment le nombre très élevé d'évènements à analyser, la présence d'évènements aberrants et de populations distribuées de façon asymétrique.

3. Automatisation de l'analyse des résultats

Il existe deux types de méthodes d'analyse de résultats de cytométrie, les méthodes supervisées et non-supervisées. Pour les méthodes supervisées, deux groupes de variables sont retrouvées, les variables descriptives (valeurs mesurées ou calculées lors de l'acquisition) et les variables dépendantes (par exemple le type cellulaire). Pour appliquer une méthode supervisée, les valeurs des variables dépendantes doivent être connues pour un grand nombre d'échantillons (données dites d'entraînement) afin d'identifier la relation entre les évènements et leurs variables. Pour les méthodes non-supervisées, toutes les variables sont traitées de la même façon sans dépendance entre variables.

a. Définition des données

La CFM peut mesurer d'autres particules que des cellules comme des bactéries, du sperme, du plancton ou des virus. Un évènement est défini par tout objet analysé par le cytomètre. Cependant, deux particules passant au même moment dans la fenêtre de détection peuvent être interprétées comme un seul évènement, ce sont des doublets. On peut nommer N le nombre d'évènements analysés, p le nombre de paramètres mesurés ou calculés par le cytomètre et les données $\underline{x} = \{x_1, \dots, x_i, \dots, x_N\}$, où chaque x_i correspond à l'ensemble des p mesures pour un évènement et chaque mesure correspond à un paramètre. De plus, x_{ij} est la valeur du $j^{\text{ème}}$ paramètre pour le $i^{\text{ème}}$ évènement, où $1 \leq i \leq N$ et $1 \leq j \leq p$.

Le set de données \underline{x} est une matrice composée de $N \times p$ vecteurs, où le nombre de paramètres p (généralement autour de 15) est limité par le cytomètre et le nombre N (autour de 10^6) correspond au nombre de cellules analysées dans l'échantillon biologique.

b. Méthodes supervisées

Il existe différentes méthodes supervisées comme les arbres de classification et de régression (Breiman et al., 1984), la méthode des réseaux de neurones artificiels (Boddy and Morris, 1999) ou encore la méthode des machines à vecteurs de support (Scholkopf and Smola, 2001). L'inconvénient majeur de ces méthodes est qu'elles nécessitent l'utilisation de données d'entraînement afin d'associer les évènements d'entrée à une population cellulaire prédéfinie. Les données

d'entraînement doivent être représentatives de l'ensemble des populations cellulaires, ces dernières n'étant pas toujours disponibles.

Avec ce type de méthodes, si une nouvelle population cellulaire apparaît dans les données test, elle ne peut être reconnue. De plus, un écart important entre deux centroïdes d'une même population pour deux échantillons distincts peut entraîner une mauvaise classification des événements selon les algorithmes utilisés.

c. Méthodes non supervisées

Les méthodes non-supervisées doivent pouvoir analyser un grand nombre de données et identifier des clusters de différentes formes avec une densité ou un pourcentage d'évènements variable. L'automatisation des résultats peut être schématisée par un regroupement (en anglais, « clustering ») des cellules dans des groupes ou clusters, où les cellules d'un même cluster présentent les mêmes caractéristiques immunophénotypiques. Il existe principalement trois approches de clusterisation : (i) les modèles basés sur la recherche de centre de gravité (algorithme des k -means), (ii) les modèles basés sur la distribution des données appelés mélanges finis (en anglais, « finite mixture model ») et (iii) les modèles basés sur la densité des données et donc l'exploration spatiale d'histogrammes. Avant de réaliser le « clustering », certains modèles nécessitent une estimation du nombre de clusters. Il existe de nombreuses approches pour choisir le nombre de clusters comme le rééchantillonnage, la validation croisée ou des approches automatisées comme les méthodes BIC (« Bayesian Information Criteria ») (Lo et al., 2008) ou ICL (« Integrated Complete Likelihood ») (Finak et al., 2009).

i. Modèles basés sur l'algorithme des k -means

Il existe de nombreux modèles basés sur l'algorithme des k -means. Cet algorithme permet de répartir un ensemble de données en k classes homogènes sur la base du critère des plus proches voisins. Celui-ci signifie que chaque individu est affecté à une classe s'il est proche de son centre de gravité. L'utilisation de ces modèles nécessite de prédéterminer le nombre de clusters dans lesquels les événements vont être classifiés. Il existe de nombreux packages R basés sur l'algorithme des k -means, disponibles dans le projet BioConductor.

Le premier modèle des k -means dédié à l'analyse de la CFM a été développé par Murphy en 1985 (Murphy, 1985). Ce modèle n'utilisait que des formes sphériques pour délimiter les clusters et en 1992, Demers et ses collègues ont développé un autre modèle toujours basé sur l'algorithme des k -means mais cette fois pouvant utiliser des formes non sphériques (elliptiques) pour délimiter les populations. Pour cela des matrices de variance/covariance sont utilisées afin de modéliser les

données sous forme d'une distribution autour de chaque centre de gravité de cluster (Demers et al., 1992). Trois ans plus tard, le modèle fuzzy k -means a été développé afin de permettre à chaque évènement d'appartenir à plusieurs clusters (Rousseeuw et al., 1995) et ainsi d'augmenter les performances de l'algorithme (Wilkins et al., 2001).

Contrairement à un algorithme des k -means traditionnel, le package `flowMeans` peut identifier des populations concaves en fusionnant différents clusters pour former une population (Aghaeepour et al., 2011). Ce package est une extension de `flowMerge` (voir § II.3.c.ii Modèles de mélanges finis) en gérant la fusion des clusters avec un algorithme plus rapide. En effet, l'utilisation de l'algorithme des k -means limitant la sélection des cellules à une forme sphérique permet de diminuer considérablement le temps de calcul par rapport à des modèles de mélanges qui sont plus flexibles mais plus lent.

ii. Modèles de mélanges finis

Les modèles de mélanges finis supposent que les données suivent une loi normale (distribution de type gaussienne) ou une loi de Student (distribution de type t). Ces modèles permettent de délimiter les clusters sous des formes non sphériques (elliptiques) contrairement aux premiers algorithmes des k -means (Aghaeepour et al., 2011).

Demers et ses collègues sont les premiers à avoir utilisé une méthode modélisant les données sous forme d'une distribution de type gaussienne (voir §2 II.3.c.i Modèles basés sur l'algorithme des k -means) (Demers et al., 1992). Ce modèle repose sur l'hypothèse que chaque composant suit une loi normale ce qui est rarement observé en CFM. Afin de contourner cette limitation, un nouveau modèle de mélanges a été développé, il suppose que les données suivent une loi de Student (« t -mixture ») et transforment les données grâce à une transformation Box-Cox (Lo et al., 2008). La distribution t est similaire à la distribution gaussienne avec un poids plus important au niveau des bords. La transformation Box-Cox quant à elle permet de recentrer les valeurs biaisées. Ce modèle associé à cette transformation permet de mieux supporter les valeurs aberrantes souvent observées en CFM. Avec d'autres modèles, ces valeurs mal gérées entraînent souvent une surestimation du nombre de classes. Dans ce modèle, la transformation, l'identification des valeurs aberrantes et le « clustering » est réalisé simultanément pour augmenter la performance de l'algorithme. Le package `flowClust` du logiciel R implémente ce modèle (Lo et al., 2008). Ce dernier présente cependant une limitation majeure, certaines populations rares peuvent être considérées comme des valeurs aberrantes ou faisant parties d'une autre population cellulaire plus large. Pour pallier ce problème, `flowMerge`, autre package R dérivé du précédent package, a été développé (Finak et al., 2009). Il est basé sur le même modèle mais estime un nombre plus important de clusters. Cette surestimation

permet de détecter les populations rares avant de fusionner les clusters qui semblent similaires. Le package FLAME, développé par Pyne et ses collègues, est également basé sur un modèle de type « t-mixture » où les valeurs ne sont pas transformées (Pyne et al., 2009). FLAME permet de conserver la distribution originale et donc l'asymétrie des données ainsi que le poids créé par les valeurs aberrantes sur les bords des distributions, ces dernières pouvant représenter des populations rares.

iii. Modèles basés sur l'exploration spatiale des histogrammes

Le programme FLOCK (pour « FLOW Clustering without K ») utilise un algorithme en libre accès basé sur la densité des clusters (Qian et al., 2010). Le programme commence par partitionner chaque dimension en classes de taille égale. Une fois toutes les dimensions partitionnées, le programme détermine le nombre d'évènements dans chaque région qui seront qualifiées « dense » si le nombre d'évènements dépasse un certain seuil. Les régions denses et adjacentes (régions côte à côte dans la même dimension qui gardent la même position l'une par rapport à l'autre dans toutes les autres dimensions) sont fusionnées pour former un seul groupe. Les centres de gravités sont ensuite déterminés à partir de tous les évènements formant les régions denses fusionnées. Tous les évènements sont ensuite associés à leur plus proche centre de gravité. Une fois la classification de l'ensemble des évènements réalisée, le centre de gravité de chaque cluster est recalculé.

La méthode curvHDR repose sur deux concepts, (i) la recherche de courbures (en anglais, « **curvature** ») négatives (vallées) séparant (ii) des régions de forte densité (en anglais, « Highest Density Régions » pour HDR) (Naumann et al., 2010). Elle peut être appliquée sur des données analysées sur une, deux voire trois dimensions. La méthode est implémentée à travers la fonction curvHDRfilter du package R flowCore.

L'algorithme Misty Mountain est également basé sur l'exploration spatiale d'histogrammes. Son nom vient de l'image que les développeurs avaient de l'algorithme : des montagnes dont les sommets peuvent être observés au-dessus de nuages brumeux, au fur et à mesure que la brume descend les clusters sont découverts (Sugár and Sealfon, 2010). Les données sont dans un premier temps générées sous forme d'histogrammes séparés en partitions. L'algorithme commence par analyser les données avec un niveau de fréquence élevé où seul le pic principal dépasse ce niveau. Le niveau est ensuite abaissé afin de découvrir d'autres pics et d'élargir les clusters déjà découverts. L'algorithme s'arrête lorsque deux clusters se touchent. Cette méthode rapide ne nécessite pas d'estimer le nombre de clusters au préalable. Le package R flowPeaks est une extension de cet algorithme qui associe la recherche de pics de densité à l'algorithme des *k*-means. Il utilise un large nombre de clusters de départ pour classifier les cellules dans différents petits clusters afin d'identifier les populations rares (Ge and Sealfon, 2012).

d. Comparaison des différentes méthodes

Lorsque le nombre de classes est connu, les méthodes supervisées peuvent être adaptées à l'automatisation de l'analyse des résultats de cytométrie. Si une automatisation intégrale est nécessaire sans connaissance préalable du jeu de données, seules les méthodes non-supervisées sont adaptées. Suite au développement des différentes méthodes dédiées à l'identification des populations cellulaires à partir de données de CFM, le projet FloWCap (« Flow Cytometry : Critical Assessment of Population Identification Methods ») a été initié pour comparer les performances de ces différentes méthodes. Les critères de comparaison de ces méthodes sont la F -mesure, la vitesse d'exécution ainsi que le « rank score ».

$$\text{Avec } F - \text{ mesure} = 2 * \left(\frac{\text{précision} - \text{sensibilité}}{\text{précision} + \text{sensibilité}} \right)$$

$$\text{où la } \textit{spécificité} = \frac{\text{vrais positifs}}{\text{vrais positifs} + \text{faux positifs}} \text{ et la } \textit{sensibilité} = \frac{\text{vrais positifs}}{\text{vrais positifs} + \text{faux négatifs}}$$

La F -mesure est de 1 lorsque la reproduction entre la méthode automatique et la méthode manuelle est parfaite, sans faux positif ou négatif. La valeur du rank score correspond à l'addition du rang d'une méthode par rapport aux autres pour chaque jeu de données utilisé. Une valeur maximale sera égale au nombre de méthodes comparées multiplié par le nombre de jeux de données utilisés. Concernant l'automatisation complète de l'analyse des résultats de CFM, les méthodes ADICyt (logiciel commercialisé), flowMeans, FLOCK et FLAME montrent les meilleures performances parmi un ensemble de 12 méthodes sur 5 jeux de données indépendants. La méthode la plus performante, ADICyt, requiert néanmoins un temps de calcul très important comparé aux trois autres méthodes qui sont bien plus rapides et raisonnablement aussi performantes (Aghaeepour et al., 2013). A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode unique qui puisse analyser l'ensemble des jeux de données de CFM.

Objectifs de la thèse

Le MM est une hémopathie maligne caractérisée par l'accumulation d'un clone plasmocytaire. Le traitement par une chimiothérapie à forte dose et une greffe de cellules souches hématopoïétiques contribue à l'augmentation de la survie des patients atteints de MM. Cependant, dans la majorité des cas, des cellules tumorales persistent dans la moelle osseuse et provoquent la rechute des patients. La détection précoce des cellules cancéreuses permet de réaliser la seconde ligne de traitement plus rapidement, rendant ainsi le traitement plus efficace. L'avantage majeur de la CFM est sa capacité à détecter la MRD trois mois avant les techniques conventionnelles (myélogramme, électrophorèse et dosage des protéines) (Paiva et al., 2011).

Mon travail de thèse s'inscrit dans cette thématique et a permis de développer une solution complète dédiée à l'identification fine des plasmocytes normaux et tumoraux au sein d'échantillons de patients atteints de MM en CFM. L'analyse d'un échantillon biologique en CFM comprend trois principales étapes qui sont la préparation de cet échantillon, l'analyse en CFM et le traitement des résultats. Nous nous sommes intéressés à la simplification et à l'automatisation des étapes en amont et en aval de l'analyse en cytométrie qui seront respectivement appelées étapes pré-analytique et post-analytique. Concernant l'étape pré-analytique, nous avons élaboré un panel simple, sensible et innovant (Article 2 et Brevet 2) pour identifier les cellules plasmocytaires normales et tumorales et ainsi suivre la MRD du MM. Nous avons également développé une maquette de robot préparateur pour automatiser l'ensemble des étapes de préparation de l'échantillon, de la lyse érythrocytaire à l'immunophénotypage (Résultats préliminaires). Pour automatiser le traitement des résultats issus de l'analyse CFM et la détection des cellules tumorales, nous avons créé un logiciel programmé en langage C++ (Article 2). Enfin, nous avons construit un score de risque basé sur l'expression de gènes codants pour des protéines de surface (gènes CD) qui prédit la survie de patients atteints de MM au moment du diagnostic et de la rechute (Article 1 et Brevet 1). Ce score simple pourrait être transposable à la CFM et ainsi être intégré dans notre solution pour prédire la survie des patients lors du processus d'aide au diagnostic ou de suivi de la MRD.



Résultats



*« Ce qui fait le prix de la science, de la connaissance
abstraite, c'est qu'elle est communicable »*

Arthur Schopenhauer

📄 **Article 1. CD24, CD27, CD36 and CD302 gene expression for outcome prediction in patients with multiple myeloma**

Elina Alaterre, Sebastien Raimbault, Hartmut Goldschmidt, Anja Seckinger, Dirk Hose, Bernard Klein, Jerome Moreaux

En révision à Oncotarget

📄 **Article 2. Automated and simplified identification process of normal and abnormal plasma cells in multiple myeloma by flow cytometry**

Elina Alaterre, Sébastien Raimbault, Jean-Michel Garcia, Guilhem Requirand, Bernard Klein, Jérôme Moreaux

Soumis à Cytometry Part B

📄 **Résultats préliminaires (non publiés) : Automatisation de la préparation d'un échantillon biologique analysé en CFM**

Etude 1 : Optimisation du protocole de préparation manuelle d'un échantillon de moelle osseuse

Etude 2 : Développement d'un préparateur

Article 1

CD24, CD27, CD36 and CD302 gene expression for outcome prediction in patients with multiple myeloma

Elina Alaterre, Sébastien Rimbault, Hartmut Goldschmidt, Anja Seckinger, Dirk Hose, Bernard Klein, Jérôme Moreaux

En révision à Oncotarget

Ces résultats ont fait l'objet d'une communication orale, d'une communication affichée sous forme de poster et d'un brevet.

Alaterre, E., Rimbault, S., Goldschmidt, H., Seckinger, A., Hose, D., Klein, B., Moreaux, J. (Présentation orale et poster). Combination of CD24, CD27, CD36 and CD302 expression predicts outcome in multiple myeloma patients. « 20e Congrès Annuel de l'Association Française de Cytométrie », 8-10 novembre 2016, Montpellier.

Alaterre, E., Rimbault, S., Goldschmidt, H., Seckinger, A., Hose, D., Klein, B., Moreaux, J. (**Annexe 1** – n° EP16305651 déposé le 3 juin 2016). Combination of CD24, CD27, CD36 and CD302 expression predicts outcome in multiple myeloma patients.

Comme décrit précédemment, le MM est une hémopathie maligne définie par l'accumulation d'un clone plasmocytaire tumorale qui reste incurable dans la majorité des cas. Malgré les avancées thérapeutiques, la persistance de clones dans la moelle osseuse après le traitement entraîne quasiment systématiquement la rechute des patients.

Dans cette étude, nous avons analysé les résultats d'expression de gènes de patients atteints de MM au moment du diagnostic grâce à la technique des biopuces. Nous nous sommes focalisés sur les gènes codants des protéines de surface (gènes CD). Nous avons regardé quels étaient les gènes dérégulés dans les cellules plasmocytaires de patients atteints de MM par rapport aux cellules plasmocytaires normales de sujets sains. Nous avons détecté des gènes surexprimés qui pourraient être d'éventuelles cibles thérapeutiques, ainsi que des gènes sous-exprimés qui permettraient de

discriminer les plasmocytes tumoraux des plasmocytes normaux. En plus des résultats d'expression, nous avons récupéré les données de survie de ces mêmes patients afin d'identifier les gènes avec une valeur pronostique. Dans deux cohortes indépendantes de patients atteints de MM, nous avons montré que l'expression des gènes CD24, CD27, CD36 et CD302 était associée à une bonne survie. La combinaison de l'information de l'expression de ces quatre gènes a permis de construire à un score de risque séparant les patients de bon et de mauvais pronostic. Ce score a été validé dans trois autres cohortes indépendantes de patients et est lui-même indépendant des autres scores conventionnels, basés sur l'expression de gènes (Decaux et al., 2008; Hose et al., 2011a; Rème et al., 2013b; Shaughnessy et al., 2007).

Cette étude a permis d'identifier de nouveaux gènes dont la fonction dans le MM n'a pas encore été décrite. Ces derniers pourraient être de nouvelles cibles thérapeutiques ou permettre de discriminer les plasmocytes tumoraux des plasmocytes normaux lors de leur identification en CFM au moment du diagnostic ou du suivi de la MRD. Le score que nous avons construit sur la base de l'expression de quatre gènes prédit la survie des patients atteints de MM au moment du diagnostic ainsi qu'à la rechute et a fait l'objet d'une demande de brevet (n°EP16305651 - **Annexe 1**). Ce score simple, rapide, et peu coûteux pourrait être transférable à la CFM une fois l'expression protéique de ces quatre gènes validée.

CD24, CD27, CD36 and CD302 gene expression for outcome prediction in patients with multiple myeloma

Elina Alaterre^{6,2}, Sebastien Rimbault⁶, Hartmut Goldschmidt^{4,5}, Anja Seckinger^{4,5}, Dirk Hose^{4,5}, Bernard Klein^{1,2,3}, Jerome Moreaux^{1,2,3}

¹ Department of Biological Haematology, CHU Montpellier, Montpellier, France

² Institute of Human Genetics, CNRS-UPR1142, Montpellier F-34396, France

³ University of Montpellier 1, UFR de Médecine, Montpellier, France

⁴ Medizinische Klinik und Poliklinik V, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Germany

⁵ Nationales Centrum für Tumorerkrankungen, Heidelberg, Germany

⁶ HORIBA Medical, Parc Euromédecine, 34184 Montpellier Cedex 4, France

Corresponding author: Jérôme Moreaux,
Laboratory for Monitoring Innovative Therapies
Department of Biological Hematology
Hôpital Saint-Eloi - CHRU de Montpellier
80, av. Augustin Fliche
34295 Montpellier Cedex 5
IGH - Institute of Human Genetics
CNRS UPR 1142
<http://www.igh.cnrs.fr/>
phone: +33 (0)4 67 33 79 03
fax: +33 (0)4 67 33 70 36
mail: jerome.moreaux@igh.cnrs.fr

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a B cell neoplasia characterized by clonal plasma cell (PC) proliferation. Minimal residual disease monitoring by multi-parameter flow cytometry is a powerful tool for predicting treatment efficacy and MM outcome.

Using Affymetrix microarrays, we analyzed the expression and the prognostic value of genes encoding cluster differentiation (CD) surface antigens in bone marrow plasma cells (BMPC) of healthy controls (n=7) and in malignant myeloma cells (MMC) of patients with MM (HM cohort, n=206). Nine genes were significantly overexpressed and 16 were significantly downregulated in MMC compared with BMPC (ratio ≥ 2 ; FDR < 0.05 ; 1000 permutations). Expression of four of CD genes (*CD24*, *CD27*, *CD36* and *CD302*) was associated with a prognostic value in two independent cohorts of patients with MM (HM cohort and TT2 cohort, n=345). The expression level of these four genes was then used to develop a CD gene risk score that classified patients in two groups with different survival ($P = 2.06E-6$) in the HM training cohort. The prognostic value of the CD gene risk score was validated in two independent cohorts of patients with MM (TT2 cohort and Hovon cohort, n=282 patients). The CD gene risk score remained a prognostic factor that separated patients in two groups with significantly different overall survival also when using publicly available data on pre-treatment samples from a cohort of relapsing patients treated with bortezomib (n=188). In conclusion, the CD gene risk score allows identifying high risk patients with MM based on

CD24, CD27, CD36 and CD302 expression.

INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a B cell neoplasia characterized by accumulation of clonal malignant plasma cells (MMC) in bone marrow. In the United States and in Europe, MM affects 20 000 new patients per year (Raab et al., 2009; Teitelbaum et al., 2013). MM is the second most prevalent hematological malignancy and remains an incurable disease in most cases with a median survival of 5-7 years (Raab et al., 2009). The treatment of relapsed/refractory patients is challenging. Monoclonal antibodies associated with other agents, such as immunomodulatory drugs or proteasome inhibitors, are showing promising results (Donato et al., 2014; van de Donk et al., 2012). However, the long-term clinical outcome of patients with MM is still heterogeneous.

The cluster of differentiation (CD) includes cell surface molecules that are used for cell immunophenotyping. CD19, CD20, CD27, CD28, CD56 and CD117 are usually employed to discriminate normal bone marrow plasma cells (BMPC) from MMC (Rawstron et al., 2008). The expression of these CD markers is not homogeneous in all MMC. Indeed, they are not aberrantly expressed in all patients with MM and their expression level is heterogeneous among patients and MM subclones (Gupta et al., 2009; Raja et al., 2010; Seegmiller et al., 2007; Tembhare et al., 2014). In this study, we analyzed and compared the expression of genes coding for CD antigens in BMPC and primary MMC from newly diagnosed patients using microarrays. We identified new CD genes that are differentially expressed between normal and

malignant plasma cells. Furthermore, we found that the expression level of *CD24*, *CD27*, *CD36* and *CD302* has a prognostic value in independent cohorts of newly diagnosed patients with MM. Based on the expression level of *CD24*, *CD27*, *CD36* and *CD302*, we then developed a new CD gene risk score that allows the identification of high-risk patients with MM at diagnosis and at relapse.

RESULTS

CD genes differentially expressed in normal BMPC and MMC

A list of 266 probesets representative of genes encoding CD molecules was defined using the Human Cell Differentiation Molecules database (<http://www.hcdm.org>) (Supplementary Table S1). Comparison of CD gene expression in BMPC from healthy controls and MMC samples from patients with MM (HM cohort) using Significance Analysis of Microarrays (SAM) showed that nine CD genes were significantly overexpressed in MMC compared with BMPC and 16 were significantly downregulated [ratio ≥ 2 ; False Discovery Rate (FDR) < 0.05 ; 1000 permutations] (Table 1 and 2) (Figure 1). Among the CD genes significantly overexpressed in MMC samples, the biological function of *CD200*, *CD1d*, *CD47*, *CD59* and *CD32* (*Fc γ RII*) in MM has been already investigated (Alcindor et al., 2006; Kim et al., 2012; Moreaux et al., 2006, 2008; Olteanu et al., 2012; Rendtlew Danielsen et al., 2007; Spanoudakis et al., 2009; Williams et al., 2013; Xiang et al., 2007; Zhou et al., 2008). On the other hand, *CD109*, *CD2BP2*, *CD300a* and *CD320* could represent new potential MMC CD markers (Table 1). The expression of *CD320* and *CD2BP2* was also significantly higher in human MM cell lines (HMCL; n=25) [ratio ≥ 2 , FDR $<$

0.05; 1000 permutations] compared with MMC, suggesting that they could be involved in MM progression (Figure 1) (Supplementary Table S2A).

Among the 16 CD genes that were significantly downregulated [ratio ≥ 2 ; FDR < 0.05 ; 1000 permutations] in MMC compared with normal BMPC samples (Table 2), CD19 and CD27 are already used to discriminate BMPC from MMC (Rawstron et al., 2015; Robillard et al., 2014; Schmidt-Hieber et al., 2013b). Moreover, 11 of these 16 CD genes were also significantly downregulated in HMCL [ratio ≥ 2 , FDR < 0.05 ; 1000 permutations] compared with primary MMC (Figure 1) (Supplementary Table S2B).

Prognostic value of CD gene expression in MM and development of a CD gene risk score

Using the Maxstat R function and the Benjamini Hochberg multiple testing correction (Kassambara et al., 2012), high expression of four genes (*CD24*, *CD27*, *CD36* and *CD302*), among the 266 CD probesets, was associated with longer overall survival (OS) in both training and validation cohorts (HM cohort: n=206, and TT2 cohort: n=345, respectively) (Figure 2 A and B).

Moreover, by classifying patients with MM in different molecular subgroups (Zhan et al., 2006), we found that *CD24*, *CD27* and *CD36* were significantly downregulated in MMC samples from patients with MM classified in the proliferation subgroup. *CD24* was also significantly downregulated in the hyperploid subgroup, whereas *CD27* and *CD302* were downregulated in the CD1 subgroup. Conversely, in the CD2 subgroup, *CD27* was significantly overexpressed. Finally, *CD302* was significantly overexpressed in the low

bone disease subgroup and downregulated in the MAF subgroup (Supplementary Figure S1).

These four CD genes were then used to create a CD gene risk score. To combine the prognostic information of *CD24*, *CD27*, *CD36* and *CD302* expression, first a simple staging scoring was built by splitting patients from the HM cohort in five groups according to *CD24*, *CD27*, *CD36* and *CD302* expression in their MMC samples (group 1: low expression of all four genes; group 2: high expression of only one; group 3: high expression of two; group 4: high expression of three of the four genes; group 5: high expression of all four genes). Kaplan Meier analysis of the five different groups (Figure 3A) was performed and when two consecutive groups did not show any significant difference, they were merged. This approach resulted in two groups with different OS. Group 1 (72.8% of all patients) comprised patients with high expression of all or two or three of the four CD genes, whereas group 2 (the remaining 27.2%) included patients with high expression of only one CD gene or low expression of all CD genes (Figure 3B). Group 1 (low risk) had a not reached median OS and group 2 (high risk) had a median OS of 50.6 months ($P = 2.06E-6$) (Figure 3B).

The prognostic value of the CD gene risk score was validated in two independent cohorts of newly diagnosed patients (TT2 cohort; n=345 patients and Hovon cohort; n=282 patients). Again, in both cohorts, in group 1 (low risk) the median OS was not reached, whereas in group 2 (high risk) the median OS was 55.5 months ($P = 1.6E-6$) in the TT2 cohort and 33.4 months ($P = 1.1E-5$) in the Hovon cohort (Figure 3C and D).

The CD gene risk score could also predict the event-free survival (EFS) in the HM cohort ($P = 3.3E-5$) (Figure 4A). This prognostic value was validated in the TT2 ($P = .0001$) and Hovon cohorts ($P = .01$) (Figure 4B and C).

We then investigated whether the CD gene risk-score could have a prognostic value for patients at relapse using a cohort of relapsing patients treated with bortezomib (Mulligan cohort: $n=188$). The CD gene risk score could separate patients in two groups with significantly different OS (median OS of 11.3 months for the high-risk group and of 23.8 months for the low-risk group; $P = 0.0001$) (Figure 3E).

COX univariate and multivariate analyses of the CD gene risk score

The CD gene risk score prognostic value was then compared with that of conventional prognostic factors and other gene expression-based risk scores. In univariate COX analyses, the CD gene risk score, International Staging system (ISS) (Greipp et al., 2005), β 2-microglobulin (β 2M) and albumin levels, t(4;14) translocation, deletion of 17p (del17p), high-risk score (HRS) (Shaughnessy et al., 2007), Intergroupe Francophone du Myelome (IFM) score (Decaux et al., 2008), gene expression-based proliferation index (GPI) (Hose et al., 2011a) and risk stratification (RS) score (Rème et al., 2013b) showed a prognostic value in both the HM and TT2 cohorts (Table 3). In 2 by 2 analyses with ISS, β 2M, t(4; 14), HRS, GPI and RS, the CD gene risk score was still independently associated with OS in the HM cohort (Table 3). In the TT2 cohort, it remained significant when tested with t(4;14), HRS, IFM score, GPI and RS score (Table 3). When all parameters were tested together, the prognostic value of the CD gene risk score, β 2M, t(4; 14), IFM score and RS

score remained significant in the HM cohort. In the TT2 cohort, the CD gene risk score, $t(4; 14)$ and HRS remained independent prognostic factors (Table 3).

MMC from low-risk patients according to the CD gene risk score have a mature BMPC gene signature, whereas MMC from high-risk patients are characterized by high proliferation and MYC target gene-related signatures.

Finally, the gene expression profiles of MMC samples from patients of the HM cohort classified as high- and low-risk based on their CD gene risk score ($n=71$ and $n=135$, respectively) were compared by using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Genes related to mature BMPC (TARTE_PLASMA_CELL_VS_PLASMABLAST_UP, $P=0.003$) and to normal BMPC (ZHAN MULTIPLE MYELOMA DN, $P=0.01$) were significantly enriched in MMC samples from the low-risk CD gene risk score group (Supplementary Figure S2 A). Conversely, MMC samples from the high-risk group were characterized by a significant enrichment of genes related to undifferentiated plasmablasts (MOREAUX MULTIPLE MYELOMA BY TACI DN, $P<0.0001$), MYC target genes (SCHLOSSER MYC TARGETS REPRESSED BY SERUM, $P=0.01$) and the myeloma CD1 molecular subgroup (ZHAN MULTIPLE MYELOMA CD1 UP, $P=0.01$) (Supplementary Figure S2 B).

DISCUSSION

In our study, we compared CD antigens expression between normal and malignant plasma cells to identify new potential markers to discriminate

normal from malignant plasma cells, new potential therapeutic targets for monoclonal-based treatments and new prognostic factors.

Among the differentially expressed CD genes, *CD11a*, *CD19*, *CD27*, *CD52*, *CD79a*, *CD81* and *CD82* were previously shown to be downregulated in MMC compared to BMPC (Paiva et al., 2013; Rawstron et al., 2006; Tanaka et al., 2009; Tohami et al., 2007). *CD19*, *CD27* and *CD81* are used to discriminate between normal and abnormal PCs in patients with MM (Rawstron et al., 2008). Moreover, we found a significant downregulation of new surface antigens that could be useful to discriminate MMC from normal BPMC: *CD5* protein like (*CD5L*), *CD16*, *CD24*, *CD36*, *CD68*, *CD80*, *CD84*, *CD99* and *CD163* (Supplementary Table S3). *CD5L* is involved in modulating leukocyte migration and the inflammatory response. *CD5L* in combination with transforming growth factor-beta inhibits B lymphocytes proliferation (Yusa et al., 1999). *CD36* is a scavenger *CD5L* receptor and the cellular uptake of this protein is decreased in cells that downregulate *CD36* (Sanjurjo et al., 2015). *CD16* (*Fc γ RIII*) is a member of the Ig gene superfamily. Different groups did not observe *CD16* expression in the B lymphocyte lineage, including in BMPC (Terstappen et al., 1990) and MMC (Camp et al., 1990; Leo et al., 1992). Nevertheless, in MM, the serum level of soluble *CD16* is correlated with the disease stage. Specifically, low *CD16* expression level is associated with MM or rapidly progressing monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) compared with stable MGUS or control serum samples (Mathiot et al., 1993, 1999). *CD68*, a transmembrane glycoprotein, and *CD163*, a scavenger receptor of hemoglobin-haptoglobin complexes, are mainly expressed by

macrophages, are linked to anti-inflammation responses (Suyamı et al., 2013) and are associated with poor MM prognosis (Andersen et al., 2014). CD99 is a cell surface glycoprotein involved in leukocyte migration, adhesion and transmembrane protein transport. The level of CD99 on B-cells decreases with the maturation stage and in advanced B-cell malignancies (Husak and Dworzak, 2012). The CD24 glycolipid and the CD80 and CD84 glycoproteins are expressed on many B cells (Ayre and Christian, 2016). CD80 is involved in the regulation of the immune response by activating T-cells (Czuczman et al., 2012) and CD84 is a member of the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) family (Binsky-Ehrenreich et al., 2014). These downregulated proteins are mainly involved in cell adhesion, migration, proliferation and immune response. Downregulation of these proteins could be involved in MM development and MMC growth, survival and immune system escape. These new markers could be of interest to discriminate MMC from normal BMPC by multi-parametric flow cytometry at diagnosis and for the follow-up of patients with minimal residual disease.

Among the CD genes significantly overexpressed in MMC samples, CD1d, CD32 (Fc γ RII), CD47, CD59 and CD200 play a role in MM pathophysiology. These proteins are involved in MMC proliferation, immune response, crosstalk between MMC and bone marrow microenvironment, antitumor cell regulation, drug resistance or bone resorption (Favreau et al., 2016; Karnell et al., 2014; Kim et al., 2012; Kukreja et al., 2009; Moreaux et al., 2006; Olteanu et al., 2012; Rawstron et al., 2008; Spanoudakis et al., 2009; Williams et al., 2013; You et al., 2011; Zheng et al., 2006). We also found significant overexpression of new potential MM

surface antigens: CD2 binding protein 2 (CD2BP2), CD109, CD300a and CD320 (Supplementary Table S3). CD2BP2 interacts with CD2 and is involved in cytokine signaling, such as IL-2, in T-cells (Heinze et al., 2007). CD109 is an anchored protein with an important role in osteoclastogenesis, proliferation and tumorigenesis (Wang et al., 2013). Like for CD47 (Kim et al., 2012; Kukreja et al., 2009), CD109 targeting with anti-CD109 monoclonal antibodies could help reducing osteoclastogenesis in MM. CD300a is an immunoregulatory molecule from the same family as CD32 with a single V-like Ig domain and four immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) involved in immune response regulation (Clark et al., 2007). Phosphatidylserines expressed by apoptotic cells are CD300a ligands and upon binding, the uptake of these cells by phagocytic cells is inhibited (Lankry et al., 2013). Targeting CD300a could be of therapeutic interest to increase NK cell-mediated MMC killing. CD320 (TCbIR) is involved in cell metabolism and in cell cycle regulation. CD320 is strongly expressed by proliferating cells (Lai et al., 2011; Quadros and Sequeira, 2013; Quadros et al., 2013). Furthermore, anti-CD320 antibodies inhibit the proliferation of the lymphoma cell line L3055 (Lai et al., 2011). Monoclonal antibody-targeted therapies have shown promising results in MM (Donato et al., 2014; van de Donk et al., 2012) and our study provides new potential therapeutic targets.

We then developed a CD gene risk score based on the expression level of *CD24*, *CD27*, *CD36* and *CD302* in MMC that shows a prognostic value in four independent cohorts of patients with MM. MMC from patients in the low-risk CD gene risk score group have a significant enrichment of genes related to

normal and mature BMPC. Conversely, MMC from the high-risk CD-score patient group overexpress genes associated with undifferentiated plasmablasts. Accordingly, *CD24*, *CD27*, *CD36* and *CD302* are significantly overexpressed in mature BMPC compared with plasmablasts (Supplementary Figure S3). MMC samples from high-risk CD-score patients are also significantly enriched in genes related to *MYC* target genes and the myeloma CD1 molecular subgroup. *MYC* is an oncogene that acts as a transcription factor and is involved in various pathways, including cell cycle progression, apoptosis and cell transformation (Hoffman and Liebermann, 2008; Prochownik, 2008). In myeloma, *MYC* activation may be mediated through copy number changes or translocations where B-cell super-enhancers are juxtaposed to *MYC*, thus resulting in its overexpression (Glitza et al., 2015). *MYC* upregulation is associated with disease progression, evolution from MGUS to MM and poor prognosis (Glitza et al., 2015). *MYC* is involved in MM progression to the symptomatic stage and *MYC* abnormalities are detected in 54% of newly diagnosed patients (Tian et al., 2016). The validation of this CD gene risk score at the protein level using flow cytometry could lead to a simpler, faster and cheaper prognostic tool for routine MM diagnosis and minimal residual disease follow-up. *CD24*, *CD27*, *CD36* and *CD302* gene expression could also be combined with a flow cytometry approach using the PrimeFlow® RNA Assay to develop a powerful tool for risk stratification and outcome prediction in MM. Furthermore, it will be important to understand the functional role of *CD24*, *CD27*, *CD36* and *CD302* in MM pathogenesis and pathophysiology. In conclusion, the CD gene risk score allows the identification of high-risk

patients with MM based on the expression of four genes that encode CD surface antigens and could represent a powerful tool for simple outcome prediction in MM.

MATERIALS AND METHODS

Clinical samples and gene expression data

Affymetrix data from two independent cohorts of previously untreated patients with MM were used. The training cohort consisted of 206 patients with MM and was called Heidelberg-Montpellier (HM) cohort. This cohort also included five BMPC samples from healthy donors. Samples were obtained after signature of a written informed consent form in accordance with the Declaration of Helsinki and after approval by the Ethics Committees of Montpellier (DC-2008-417) and Heidelberg. These data are publicly available through the ArrayExpress database (E-MTAB-372). The validation cohort (TT2 cohort) included 345 patients with MM from the University of Arkansas for Medical Sciences (UAMS, Little Rock, AR, USA). These data can be accessed at the online Gene Expression Omnibus (GSE2658). The clinical characteristics of the two cohorts have been previously described (Hose et al., 2011a; Moreaux et al., 2012). Gene expression profile data from a cohort of 282 patients with MM included in the Dutch-Belgian/German HOVON-65/GMMG-HAD trial were also used (GSE19784) (Hovon cohort) (Kuiper et al., 2012). We also used Affymetrix data of 188 relapsed patients with MM subsequently treated with bortezomib (GSE9782) from the study by Mulligan *et al.* (Mulligan cohort) (Mulligan et al., 2007). The XG1, XG2, XG3, XG4, XG5, XG6, XG7, XG10, XG11, XG12, XG13, XG14, XG16, XG19, XG20 and XG21 HMCLs

were obtained as previously described (Moreaux et al., 2011). The AMO-1, LP1, L363, U266, OPM2, and SKMM2 HMCLs were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) and the RPMI8226 cell line from ATTC (Rockville, MD, USA). HMCLs were authenticated by short tandem repeat profiling and gene expression profiling using Affymetrix U133 plus 2.0 microarrays; data were deposited in the ArrayExpress public database under accession numbers E-TABM-937 and E-TABM-1088 (Moreaux et al., 2011).

Gene expression profiling and statistical analyses

Gene expression data were normalized using the MAS5 algorithm and analyzed with GenomicScape (<http://www.genomicscape.com>) (Kassambara et al., 2015). Gene expression profiles were compared using SAM. Probe sets were selected for prognostic significance using the Maxstat R function and the Benjamini Hochberg multiple testing correction. The statistical significance of differences in OS and EFS between patients' groups was calculated by using the log-rank test. Multivariate analysis was performed using the Cox proportional hazards model. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method. All analyses were done with R.2.10.1 and Bioconductor version 2.5.

Gene Set Enrichment Analysis

The gene expression levels of high risk and low risk MM patients according to the CD gene risk score were compared and genes with significantly different expression were identified for GSEA. GSEA was carried out by computing the overlap with canonical pathways and gene ontology annotations obtained from the Broad Institute, Cambridge, USA.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

1. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet*. 2009; 374: 324–39. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60221-X.
2. Teitelbaum A, Ba-Mancini A, Huang H, Henk HJ. Health Care Costs and Resource Utilization, Including Patient Burden, Associated With Novel-Agent-Based Treatment Versus Other Therapies for Multiple Myeloma: Findings Using Real-World Claims Data. *The Oncologist*. 2013; 18: 37–45. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0113.
3. Donato F, Gay F, Bringhen S, Troia R, Palumbo A. Monoclonal antibodies currently in Phase II and III trials for multiple myeloma. *Expert Opin Biol Ther*. 2014; : 1–18. doi: 10.1517/14712598.2014.908848.
4. van de Donk NWCJ, Kamps S, Mutis T, Lokhorst HM. Monoclonal antibody-based therapy as a new treatment strategy in multiple myeloma. *Leukemia*. 2012; 26: 199–213. doi: 10.1038/leu.2011.214.
5. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, Kovarova L, Lioznov M, Mateo G, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008; 93: 431–8. doi: 10.3324/haematol.11080.
6. Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, Sharma A, Jain P. Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2009; 132: 728–32. doi: 10.1309/AJCP1GYI7EHQYUYK.
7. Raja KRM, Kovarova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other

plasma cell disorders. *Br J Haematol.* 2010; 149: 334–51. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08121.x.

8. Seegmiller AC, Xu Y, McKenna RW, Karandikar NJ. Immunophenotypic Differentiation Between Neoplastic Plasma Cells in Mature B-Cell Lymphoma vs Plasma Cell Myeloma. *Am J Clin Pathol.* 2007; 127: 176–81. doi: 10.1309/5EL22BH45PHUPM8P.

9. Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D, Braylan R, Korde N, Manasanch E, Zuchlinsky D, Calvo K, Kurlander R, Bhutani M, Tageja N, Maric I, Mulquin M, et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. *Leuk Res.* 2014; 38: 371–6. doi: 10.1016/j.leukres.2013.12.007.

10. Moreaux J, Hose D, Reme T, Jourdan E, Hundemer M, Legouffe E, Moine P, Bourin P, Moos M, Corre J, Möhler T, De Vos J, Rossi JF, et al. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2006; 108: 4194–7. doi: 10.1182/blood-2006-06-029355.

11. Moreaux J, Veyrune JL, Reme T, De Vos J, Klein B. CD200: a putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 366: 117–22. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.103.

12. Olteanu H, Harrington AM, Kroft SH. CD200 expression in plasma cells of nonmyeloma immunoproliferative disorders: clinicopathologic features and comparison with plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol.* 2012; 138: 867–76. doi: 10.1309/AJCP3TQR1TFHHGAS.

13. Spanoudakis E, Hu M, Naresh K, Terpos E, Melo V, Reid A, Kotsianidis I, Abdalla S, Rahemtulla A, Karadimitris A. Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d. *Blood.* 2009; 113: 2498–507. doi: 10.1182/blood-2008-06-161281.

14. Kim D, Wang J, Willingham SB, Martin R, Wernig G, Weissman IL. Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. *Leukemia*. 2012; 26: 2538–45. doi: 10.1038/leu.2012.141.
15. Rendtlew Danielsen JM, Knudsen LM, Dahl IM, Lodahl M, Rasmussen T. Dysregulation of CD47 and the ligands thrombospondin 1 and 2 in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2007; 138: 756–60. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06729.x.
16. Alcindor T, Kimlinger T, Witzig TE. High expression of CD59 and CD55 on benign and malignant plasma cells. *Leuk Lymphoma*. 2006; 47: 919–21. doi: 10.1080/10428190500467784.
17. Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, Fairfax K, Lawlor KE, Severinson E, Walker EU, Manz RA, Tarlinton DM, Smith KGC. FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol*. 2007; 8: 419–29. doi: 10.1038/ni1440.
18. Williams EL, Tutt AL, Beers SA, French RR, Chan CHT, Cox KL, Roghanian A, Penfold CA, Butts CL, Boross P, Verbeek JS, Cragg MS, Glennie MJ. Immunotherapy targeting inhibitory Fcγ receptor IIB (CD32b) in the mouse is limited by monoclonal antibody consumption and receptor internalization. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013; 191: 4130–40. doi: 10.4049/jimmunol.1301430.
19. Zhou P, Comenzo RL, Olshen AB, Bonvini E, Koenig S, Maslak PG, Fleisher M, Hoffman J, Jhanwar S, Young JW, Nimer SD, Boruchov AM. CD32B is highly expressed on clonal plasma cells from patients with systemic light-chain amyloidosis and provides a target for monoclonal antibody-based therapy. *Blood*. 2008; 111: 3403–6. doi: 10.1182/blood-2007-11-125526.
20. Rawstron AC, Gregory WM, de Tute RM, Davies FE, Bell SE, Drayson MT, Cook G, Jackson GH, Morgan GJ, Child JA, Owen RG. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. *Blood*. 2015; 125: 1932–5. doi: 10.1182/blood-2014-07-590166.

21. Robillard N, Wuillème S, Moreau P, Béné MC. Immunophenotype of Normal and Myelomatous Plasma-Cell Subsets. *Front Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2015 May 11]; 5. doi: 10.3389/fimmu.2014.00137.
22. Schmidt-Hieber M, Gutiérrez ML, Pérez-Andrés M, Paiva B, Rasillo A, Tabernero MD, Sayagués JM, Lopez A, Bárcena P, Sanchez ML, Gutiérrez NC, San Miguel JF, Orfao A. Cytogenetic profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a study in highly purified aberrant plasma cells. *Haematologica*. 2013; 98: 279–87. doi: 10.3324/haematol.2011.060632.
23. Kassambara A, Hose D, Moreaux J, Walker BA, Protopopov A, Reme T, Pellestor F, Pantesco V, Jauch A, Morgan G, Goldschmidt H, Klein B. Genes with a spike expression are clustered in chromosome (sub)bands and spike (sub)bands have a powerful prognostic value in patients with multiple myeloma. *Haematologica*. 2012; 97: 622–30. doi: 10.3324/haematol.2011.046821.
24. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, Burington B, Anaissie E, Hollmig K, Pineda-Roman M, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. 2006; 108: 2020–8. doi: 10.1182/blood-2005-11-013458.
25. Greipp PR, Miguel JS, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, et al. International Staging System for Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 3412–20. doi: 10.1200/JCO.2005.04.242.
26. Shaughnessy JD, Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, Stewart JP, Kordsmeier B, Randolph C, Williams DR, Xiao Y, Xu H, Epstein J, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. 2007; 109: 2276–84. doi: 10.1182/blood-2006-07-038430.

27. Decaux O, Lodé L, Magrangeas F, Charbonnel C, Gouraud W, Jézéquel P, Attal M, Harousseau J-L, Moreau P, Bataille R, Campion L, Avet-Loiseau H, Minvielle S. 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. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 4798–805. doi: 10.1200/JCO.2007.13.8545.
28. Hose D, Rème T, Hielscher T, Moreaux J, Messner T, Seckinger A, Benner A, Shaughnessy JD, Barlogie B, Zhou Y, Hillengass J, Bertsch U, Neben K, et al. Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica*. 2011; 96: 87–95. doi: 10.3324/haematol.2010.030296.
29. Rème T, Hose D, Theillet C, Klein B. Modeling risk stratification in human cancer. *Bioinformatics*. 2013; 29: 1149–57. doi: 10.1093/bioinformatics/btt124.
30. Paiva B, Paino T, Sayagues J-M, Garayoa M, San-Segundo L, Martín M, Mota I, Sanchez M-L, Bárcena P, Aires-Mejia I, Corchete L, Jimenez C, Garcia-Sanz R, et al. Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. *Blood*. 2013; 122: 3591–8. doi: 10.1182/blood-2013-06-510453.
31. Rawstron AC, Laycock-Brown G, Hale G, Davies FE, Morgan GJ, Child JA, Hillmen P, Owen RG. CD52 expression patterns in myeloma and the applicability of alemtuzumab therapy. *Haematologica*. 2006; 91: 1577–8.
32. Tanaka T, Ichimura K, Sato Y, Takata K, Morito T, Tamura M, Kondo E, Ohara N, Yanai H, Sakai M, Takahashi S, Yoshino T. Frequent downregulation or loss of CD79a expression in plasma cell myelomas: potential clue for diagnosis. *Pathol Int*. 2009; 59: 804–8. doi: 10.1111/j.1440-1827.2009.02448.x.

33. Tohami T, Drucker L, Shapiro H, Radnay J, Lishner M. Overexpression of tetraspanins affects multiple myeloma cell survival and invasive potential. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2007; 21: 691–9. doi: 10.1096/fj.06-6610com.
34. Yusa S, Ohnishi S, Onodera T, Miyazaki T. AIM, a murine apoptosis inhibitory factor, induces strong and sustained growth inhibition of B lymphocytes in combination with TGF- β 1. *Eur J Immunol.* 1999; 29: 1086–93. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<1086::AID-IMMU1086>3.0.CO;2-X.
35. Sanjurjo L, Aran G, Roher N, Valledor AF, Sarrias M-R. AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease. *J Leukoc Biol.* 2015; 98: 173–84. doi: 10.1189/jlb.3RU0215-074R.
36. Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IM, Loken MR. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood.* 1990; 76: 1739–47.
37. Camp BV, Durie BG, Spier C, Waele MD, Riet IV, Vela E, Frutiger Y, Richter L, Grogan TM. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood.* 1990; 76: 377–82.
38. Leo R, Boeker M, Peest D, Hein R, Bartl R, Gessner JE, Selbach J, Wacker G, Deicher H. Multiparameter analyses of normal and malignant human plasma cells: CD38⁺⁺, CD56⁺, CD54⁺, clg⁺ is the common phenotype of myeloma cells. *Ann Hematol.* 1992; 64: 132–9.
39. Mathiot C, Teillaud J-L, Elmalek M, Mosseri V, Euller-Ziegler L, Daragon A, Grosbois B, Michaux J-L, Facon T, Bernard J-F, Duclos B, Monconduit M, Fridman WH. Correlation between soluble serum CD16 (sCD16) levels and disease stage in patients with multiple myeloma. *J Clin Immunol.* 1993; 13: 41–8. doi: 10.1007/BF00920634.

40. Mathiot C, Galon J, Tartour E, Teillaud JL, Facon T, Bataille R, Fridman WH, Sautès C. Soluble CD16 in Plasma Cell Dyscrasias. *Leuk Lymphoma*. 1999; 32: 467–74. doi: 10.3109/10428199909058404.
41. Suyanı E, Sucak GT, Akyürek N, Şahin S, Baysal NA, Yağcı M, Haznedar R. Tumor-associated macrophages as a prognostic parameter in multiple myeloma. *Ann Hematol*. 2013; 92: 669–77. doi: 10.1007/s00277-012-1652-6.
42. Andersen MN, Abildgaard N, Maniecki MB, Møller HJ, Andersen NF. Monocyte/macrophage-derived soluble CD163: a novel biomarker in multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2014; 93: 41–7. doi: 10.1111/ejh.12296.
43. Husak Z, Dworzak MN. CD99 ligation upregulates HSP70 on acute lymphoblastic leukemia cells and concomitantly increases NK cytotoxicity. *Cell Death Dis*. 2012; 3: e425. doi: 10.1038/cddis.2012.164.
44. Ayre DC, Christian SL. CD24: A Rheostat That Modulates Cell Surface Receptor Signaling of Diverse Receptors. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2016 [cited 2017 Jan 20]; 4. doi: 10.3389/fcell.2016.00146.
45. Czuczman MS, Leonard JP, Jung S, Johnson JL, Hsi ED, Byrd JC, Cheson BD. Phase II trial of galiximab (anti-CD80 monoclonal antibody) plus rituximab (CALGB 50402): Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) score is predictive of upfront immunotherapy responsiveness. *Ann Oncol*. 2012; 23: 2356–62. doi: 10.1093/annonc/mdr620.
46. Binsky-Ehrenreich I, Marom A, Sobotta MC, Shvidel L, Berrebi A, Hazan-Halevy I, Kay S, Alosin A, Sagi I, Goldenberg DM, Leng L, Bucala R, Herishanu Y, et al. CD84 is a survival receptor for CLL cells. *Oncogene*. 2014; 33: 1006–16. doi: 10.1038/onc.2013.31.
47. Favreau M, Vanderkerken K, Elewaut D, Venken K, Menu E, Favreau M, Vanderkerken K, Elewaut D, Venken K, Menu E. Does an NKT-cell-based

immunotherapeutic approach have a future in multiple myeloma? *Oncotarget*. 2016; 7: 23128–40.

48. Karnell JL, Dimasi N, Karnell FG, Fleming R, Kuta E, Wilson M, Wu H, Gao C, Herbst R, Ettinger R. CD19 and CD32b Differentially Regulate Human B Cell Responsiveness. *J Immunol Author Choice*. 2014; 192: 1480–90. doi: 10.4049/jimmunol.1301361.

49. Kukreja A, Radfar S, Sun B-H, Insogna K, Dhodapkar MV. Dominant role of CD47-thrombospondin-1 interactions in myeloma-induced fusion of human dendritic cells: implications for bone disease. *Blood*. 2009; 114: 3413–21. doi: 10.1182/blood-2009-03-211920.

50. You T, Hu W, Ge X, Shen J, Qin X. Application of a novel inhibitor of human CD59 for the enhancement of complement-dependent cytotoxicity on cancer cells. *Cell Mol Immunol*. 2011; 8: 157–63. doi: 10.1038/cmi.2010.35.

51. Zheng X, Abroun S, Otsuyama K, Asaoku H, Kawano MM. Heterogeneous expression of CD32 and CD32-mediated growth suppression in human myeloma cells. *Haematologica*. 2006; 91: 920–8.

52. Heinze M, Kofler M, Freund C. Investigating the functional role of CD2BP2 in T cells. *Int Immunol*. 2007; 19: 1313–8. doi: 10.1093/intimm/dxm100.

53. Wang Y, Inger M, Jiang H, Tenenbaum H, Glogauer M. CD109 plays a role in osteoclastogenesis. *PLoS One*. 2013; 8: e61213. doi: 10.1371/journal.pone.0061213.

54. Clark GJ, Rao M, Ju X, Hart DNJ. Novel human CD4+ T lymphocyte subpopulations defined by CD300a/c molecule expression. *J Leukoc Biol*. 2007; 82: 1126–35. doi: 10.1189/jlb.0107035.

55. Lankry D, Rovis TL, Jonjic S, Mandelboim O. The interaction between CD300a and phosphatidylserine inhibits tumor cell killing by NK cells. *Eur J Immunol*. 2013; 43: 2151–61. doi: 10.1002/eji.201343433.

56. Lai S-C, Nakayama Y, Sequeira JM, Quadros EV. Down-regulation of Transcobalamin Receptor TCbIR/CD320 by siRNA Inhibits Cobalamin uptake and Proliferation of Cells in Culture. *Exp Cell Res*. 2011; 317: 1603–7. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.02.016.
57. Quadros EV, Sequeira JM. Cellular Uptake of Cobalamin: Transcobalamin and the TCbIR/CD320 Receptor. *Biochimie*. 2013; 95: 1008–18. doi: 10.1016/j.biochi.2013.02.004.
58. Quadros EV, Nakayama Y, Sequeira JM. Saporin Conjugated Monoclonal Antibody to the Transcobalamin Receptor TCbIR/CD320 Is Effective in Targeting and Destroying Cancer Cells. *J Cancer Ther*. 2013; 4: 1074–81. doi: 10.4236/jct.2013.46122.
59. Hoffman B, Liebermann DA. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene*. 2008; 27: 6462–72. doi: 10.1038/onc.2008.312.
60. Prochownik EV. c-Myc: linking transformation and genomic instability. *Curr Mol Med*. 2008; 8: 446–58.
61. Glitza IC, Lu G, Shah R, Bashir Q, Shah N, Champlin RE, Shah J, Orlowski RZ, Qazilbash MH. Chromosome 8q24.1/c-MYC abnormality: a marker for high-risk myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2015; 56: 602–7. doi: 10.3109/10428194.2014.924116.
62. Tian E, Sawyer J, Stephens OW, Tytarenko R, Thanendrarajan S, Schinke C, Zangari M, Rhee F van, Davies FE, Walker BA, Morgan GJ. Translocations and Jumping Rearrangements at 8q24 Result in over-Expression of MYC and are Key Drivers of Disease Progression. *Blood*. 2016; 128: 115–115.
63. Moreaux J, Rème T, Leonard W, Veyrune J-L, Requirand G, Goldschmidt H, Hose D, Klein B. Development of Gene Expression–Based Score to Predict Sensitivity of Multiple Myeloma Cells to DNA Methylation Inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2012; 11: 2685–92. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0721.

64. Kuiper R, Broyl A, de Knecht Y, van Vliet MH, van Beers EH, van der Holt B, el Jarari L, Mulligan G, Gregory W, Morgan G, Goldschmidt H, Lokhorst HM, van Duin M, et al. A gene expression signature for high-risk multiple myeloma. *Leukemia*. 2012; 26: 2406–13. doi: 10.1038/leu.2012.127.
65. Mulligan G, Mitsiades C, Bryant B, Zhan F, Chng WJ, Roels S, Koenig E, Fergus A, Huang Y, Richardson P, Trepicchio WL, Broyl A, Sonneveld P, et al. Gene expression profiling and correlation with outcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood*. 2007; 109: 3177–88. doi: 10.1182/blood-2006-09-044974.
66. Moreaux J, Klein B, Bataille R, Descamps G, Maïga S, Hose D, Goldschmidt H, Jauch A, Rème T, Jourdan M, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica*. 2011; 96: 574–82. doi: 10.3324/haematol.2010.033456.
67. Kassambara A, Rème T, Jourdan M, Fest T, Hose D, Tarte K, Klein B. GenomicScape: an easy-to-use web tool for gene expression data analysis. Application to investigate the molecular events in the differentiation of B cells into plasma cells. *PLoS Comput Biol*. 2015; 11: e1004077. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004077.

Figure legend

Figure 1: Clustering of CD gene expression in normal BMPC, MMC and HMCL.

The expression of 25 genes from 266 probesets was significantly deregulated in MMC of patients with MM (HM cohort) at diagnosis compared with normal BMPC and HMLC. The expression level of each gene is color-coded (red,

higher and blue, lower expression than the mean; the color intensity represents the magnitude of deviation from the mean). MMC, normal BMPC and HMCL samples are highlighted in gray, blue and red, respectively.

Figure 2: Prognostic value of CD24, CD27, CD36 and CD302 expression level in patients with MM. Overall survival estimations using Kaplan-Meier curves in patients with MM with high (red) or low (green) expression of CD24, CD27, CD36 and CD302 in two independent cohorts: (A) HM training cohort and (B) TT2 validation cohort. Patients with high expression of CD24, CD27, CD36 and CD302 showed longer overall survival compared with patients with low expression.

Figure 3: The CD gene risk score predicts overall survival in patients with MM. (A) Kaplan-Meier estimates of the overall survival in patients from the HM cohort with high CD24, CD27, CD36 and CD302 expression (red) or low expression of one (purple), two (yellow), three (green) or all four genes (blue). When two consecutive groups showed no significant difference, they were merged. (B) This process led to the identification of two groups in the HM cohort: low-risk (high expression of at least two of the four genes; green) and high-risk patients (low expression of all four genes or high expression of only one of the four genes; red). The CD gene risk score prognostic value at diagnosis was confirmed in two other independent cohorts, (C) TT2 cohort and (D) Hovon cohort, as well as (E) in the Mulligan cohort (n=188).

Figure 4: CD gene risk score predicts event-free survival in patients with MM. (A) Kaplan-Meier estimates of event-free survival in patients with high expression of at least two of the four genes (green; low-risk group) or low expression all four genes or high expression of only one (red; high-risk group).

Table 1: Cluster differentiation genes significantly overexpressed in MMC compared with normal BMPC. Gene expression was profiled in MMC samples from the HM cohort (n=206 patients with MM) and BMPC samples (healthy controls; n=7) using Affymetrix U133 plus 2.0 microarrays. Genes that are differentially expressed between malignant and normal cells were identified using SAM supervised unpaired analysis with a 5% false discovery rate.

Table 2: Cluster differentiation genes that are downregulated in MMC compared with normal BMPC. Gene expression was profiled in MMC samples from the HM cohort (n=206 patients with MM) and BMPC samples (healthy controls; n=7) using Affymetrix U133 plus 2.0 microarrays. Genes that are significantly differentially expressed were identified using SAM supervised unpaired analysis with a 5% false discovery rate.

Table 3: Cox univariate and multivariate analyses to model overall survival (OS) in the HM (n=206 patients with MM) and TT2 (n=345 patients with MM) cohorts relative to the CD gene risk score, conventional prognostic factors and other gene expression-based risk scores.

CD-score: CD gene risk score, ISS: International Staging system, B2M: β 2-microglobulin level, t(4;14): t(4;14) translocation, del17p: deletion of 17p, HRS: high-risk score, IFM score: Intergroupe Francophone du Myelome (IFM) score, GPI: gene expression-based proliferation index, RS: risk stratification score.

Supplementary Figure S1: CD24, CD27, CD36 and CD302 expression in MM molecular subgroups. Gene expression profiling of MMC from the patients included in the TT2 cohort were used. PR: proliferation, LB: low bone disease, MS: MMSET, HY: hyperdiploid, CD1: cyclin D1-cyclin D3, CD2: cyclin D1-cyclin D3, MF: MAF. * CD24, CD27, CD36 or CD302 expression is significantly higher in the group compared with the whole cohort ($P < 0.05$). ** CD24, CD27, CD36 or CD302 expression is significantly lower in the group compared with the whole cohort ($P < 0.05$) (Student's t test).

Supplementary Figure S2: Top genes significantly associated with (A) low CD gene risk score and (B) high CD gene risk score values in patients with MM. GSEA enrichment plot with the absolute enrichment p value and the normalized enrichment score for each gene set.

Supplementary Figure S3: CD24, CD27, CD36 and CD302 expression during normal plasma cell differentiation. MB: memory B cells, PrePB: preplasmablasts, PB: plasmablasts, early PC: early plasma cells, BMPC: bone marrow plasma cells.

Supplementary Table S1: List of the 266 probesets representative of CD molecules defined using the Human Cell Differentiation Molecules database (<http://www.hcdm.org>).

Supplementary Table S2: Cluster differentiation genes that are deregulated in HMCL compared with MMC. Gene expression was profiled in MMC samples from the HM cohort ($n=206$ patients with MM) and in HMLC samples ($n=25$) using Affymetrix U133 plus 2.0 microarrays. Genes that are (A) overexpressed and (B) downregulated in HMLC compared with MMC were

identified using SAM supervised unpaired analysis with a 5% false discovery rate.

Supplementary Table S3: Description of new CD antigens deregulated in MMC compared with BMPC. We identified (A) new potential therapeutic targets for monoclonal antibody-based treatments and (B) new potential markers to discriminate between normal and malignant plasma cells.

- Normal bone marrow plasma cells (n=5)
- Primary myeloma cells of patients (n=206)
- Human myeloma cells lines (n=25)

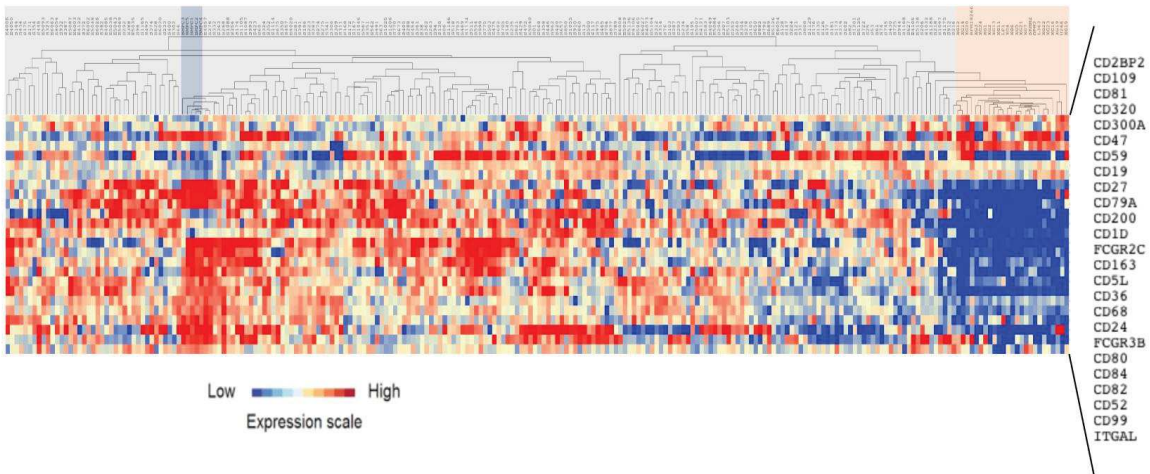


Figure 1

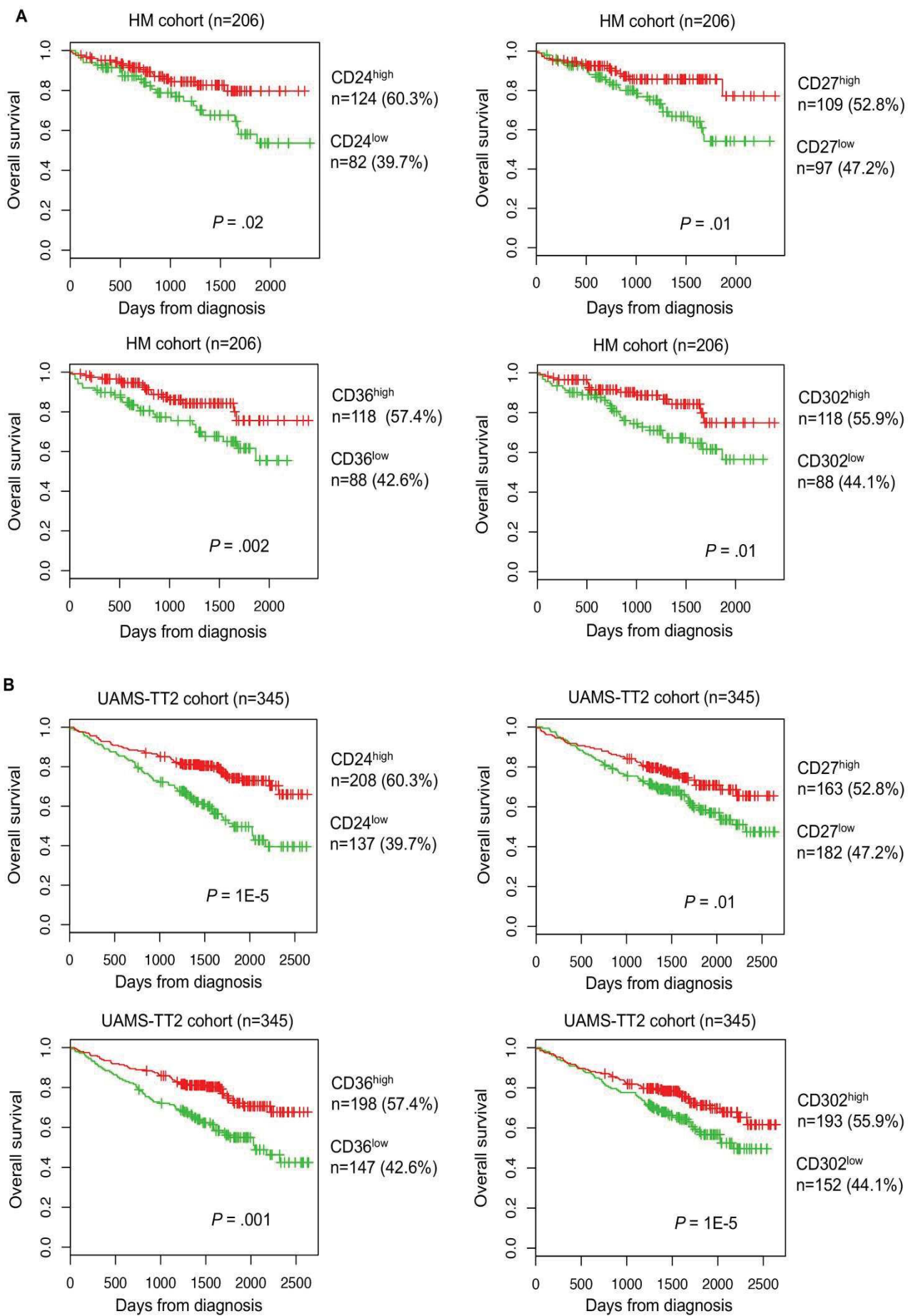


Figure 2

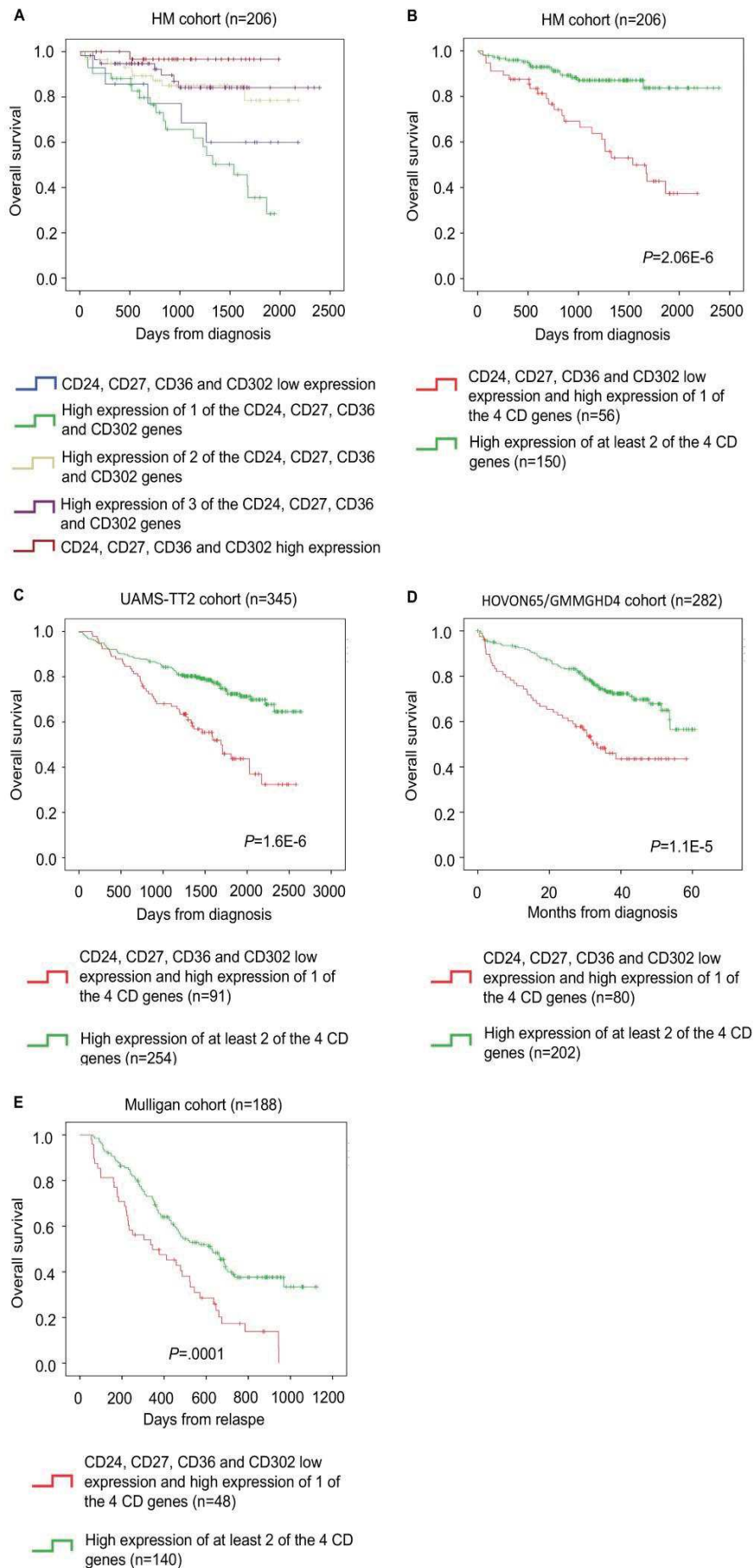
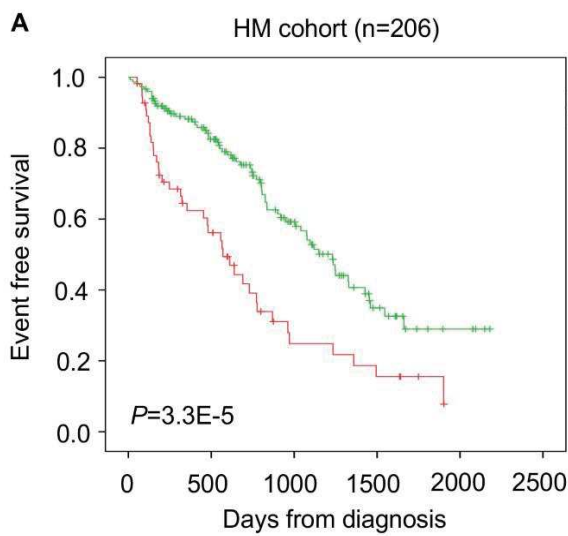
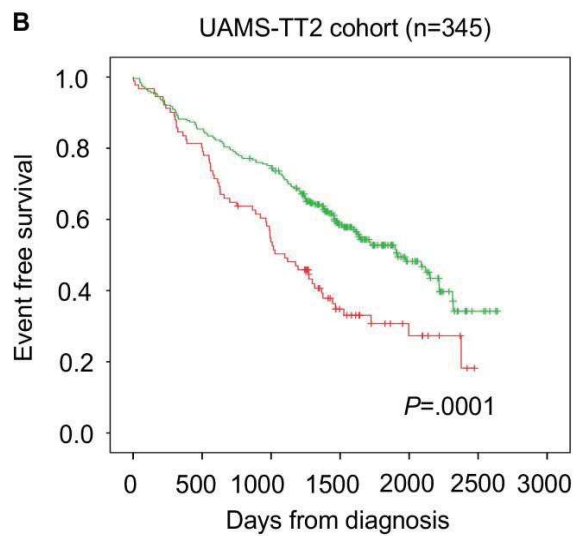


Figure 3



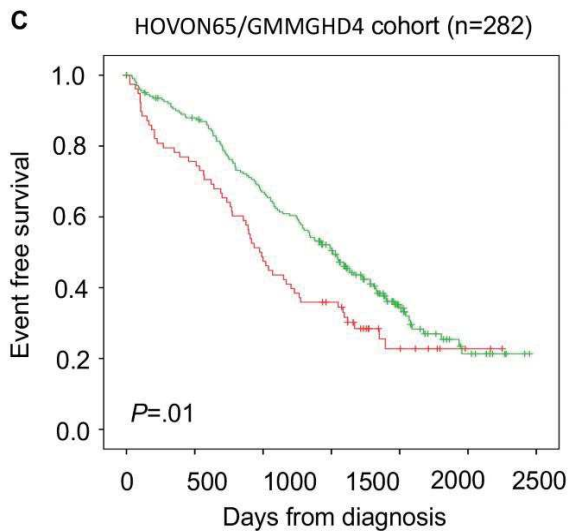
CD24, CD27, CD36 and CD302 low expression and high expression of 1 of the 4 CD genes (n=56)

High expression of at least 2 of the 4 CD genes (n=150)



CD24, CD27, CD36 and CD302 low expression and high expression of 1 of the 4 CD genes (n=91)

High expression of at least 2 of the 4 CD genes (n=254)



CD24, CD27, CD36 and CD302 low expression and high expression of 1 of the 4 CD genes (n=80)

High expression of at least 2 of the 4 CD genes (n=202)

Figure 4

| Probeset | Gene | Ratio | FDR | Affymetrix description |
|-------------|--------|-------|------|---|
| 229900_at | CD109 | 2.33 | 1.34 | CD109 molecule |
| 205789_at | CD1d | 2.12 | 1.83 | CD1d molecule |
| 209583_s_at | CD200 | 5.79 | 0.28 | CD200 molecule |
| 202256_at | CD2BP2 | 2.26 | 0.00 | CD2 (cytoplasmic tail) binding protein 2 |
| 217078_s_at | CD300a | 5.80 | 1.08 | CD300a molecule |
| 218529_at | CD320 | 2.00 | 0.28 | CD320 molecule |
| 213857_s_at | CD47 | 3.70 | 0.00 | CD47 molecule |
| 200985_s_at | CD59 | 2.85 | 0.00 | CD59 molecule, complement regulatory protein |
| 211395_x_at | FCGR2c | 2.62 | 0.28 | Fc fragment of IgG, low affinity IIc, receptor for (CD32) (gene/pseudogene) |

Table 1: Cluster differentiation genes significantly overexpressed in MMC compared with normal BMPC. Gene expression was profiled in MMC samples from the HM cohort (n=206 patients with MM) and BMPC samples (healthy controls; n=7) using Affymetrix U133 plus 2.0 microarrays. Genes that are differentially expressed between malignant and normal cells were identified using SAM supervised unpaired analysis with a 5% false discovery rate.

| Probeset | Gene | Ratio | FDR | Affymetrix description |
|-------------|---------|-------|------|--|
| 215049_x_at | CD163 | 0.16 | 0.00 | CD163 molecule |
| 206398_s_at | CD19 | 0.32 | 0.00 | CD19 molecule |
| 216379_x_at | CD24 | 0.40 | 0.00 | CD24 molecule |
| 228766_at | CD36 | 0.22 | 0.00 | CD36 molecule (thrombospondin receptor) |
| 34210_at | CD52 | 0.28 | 0.00 | CD52 molecule |
| 206680_at | CD5L | 0.25 | 0.00 | CD5 molecule-like |
| 203507_at | CD68 | 0.27 | 0.00 | CD68 molecule /// small nucleolar RNA, H/ACA box 67 |
| 205049_s_at | CD79a | 0.37 | 0.00 | CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha |
| 207176_s_at | CD80 | 0.47 | 0.00 | CD80 molecule |
| 200675_at | CD81 | 0.29 | 0.00 | CD81 molecule |
| 203904_x_at | CD82 | 0.23 | 0.00 | CD82 molecule |
| 205988_at | CD84 | 0.43 | 0.00 | CD84 molecule |
| 201029_s_at | CD99 | 0.37 | 0.00 | CD99 molecule |
| 204007_at | FCGR3b | 0.42 | 0.00 | Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor (CD16b) |
| 213475_s_at | ITGAL | 0.47 | 0.00 | integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte functionassociated antigen 1; alpha polypeptide) |
| 206150_at | TNFRSF7 | 0.25 | 0.00 | CD27 molecule |

Table 2: Cluster differentiation genes that are downregulated in MMC compared with normal BMPC. Gene expression was profiled in MMC samples from the HM cohort (n=206 patients with MM) and BMPC samples (healthy controls; n=7) using Affymetrix U133 plus 2.0 microarrays. Genes that are significantly differentially expressed were identified using SAM supervised unpaired analysis with a 5% false discovery rate.



Automated and simplified identification of normal and abnormal plasma cells in multiple myeloma by flow cytometry

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Cytometry: Part B - Clinical Cytometry</i> |
| Manuscript ID | Draft |
| Wiley - Manuscript type: | Original Article |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | Alaterre, Elina; HORIBA Medical Raimbault, Sebastien; HORIBA Medical Garcia, Jean-Michel; HORIBA Medical Reme, Thierry; Centre Hospitalier Regional Universitaire de Montpellier Requirand, Guilhem; Centre Hospitalier Regional Universitaire de Montpellier Klein, Bernard; Université Montpellier, CHU Montpellier, Institute of Research in Biotherapy Moreaux, Jerome; University of Montpellier, UFR Medecine |
| Key Words: | Multiple Myeloma |
| Controlled Key Words: | Cancer, hematology, Multiparameter analysis, prognosis |
| | |

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Automated and simplified identification of normal and abnormal plasma cells in multiple myeloma by flow cytometry

Elina Alaterre^{4,2}, Sébastien Raimbault⁴, Jean-Michel Garcia⁴, Thierry Rème¹,
Guilhem Requirand¹, Bernard Klein^{1,2,3}, Jérôme Moreaux^{1,2,3}

¹ Department of Biological Hematology, CHU Montpellier, Montpellier, France

² Institute of Human Genetics, UMR 9002, CNRS and University of Montpellier,
Montpellier F-34396, France

³ University of Montpellier 1, UFR de Médecine, Montpellier, France

⁴ HORIBA Medical, Montpellier, France

Conflict of interest:

The authors have no conflict of interest to declare.

Corresponding author: Jérôme Moreaux,
Laboratory for Monitoring Innovative Therapies
Department of Biological Hematology
Hôpital Saint-Eloi - CHRU de Montpellier
80, av. Augustin Fliche
34295 Montpellier Cedex 5
IGH - Institute of Human Genetics
CNRS UMR 9002
<http://www.igh.cnrs.fr/>
phone: +33 (0)4 67 33 79 03
fax: +33 (0)4 67 33 70 36
mail: jerome.moreaux@igh.cnrs.fr

Abstract

Background: Multiple myeloma (MM) is an incurable disease characterized by clonal plasma cell (PC) proliferation within the bone marrow (BM). Next-generation flow cytometry has become the reference tool to follow minimal residual disease (MRD). We developed a new simpler and cheaper flow cytometry method to analyze bone marrow samples in patients with MM.

Methods: To identify and characterize abnormal PC, we designed a simple panel composed of anti-CD38, anti-kappa and anti-lambda light chain antibodies, combined with two antibody pools with the same fluorophore (anti-CD19 and anti-CD27 for the negative pool, and anti-CD56, anti-CD117 and anti-CD200 antibodies for the positive pool). We also developed dedicated software for the automated identification of malignant PCs and MRD assessment. We then compared PC identification with our simple antibody panel and with the larger antibody panel routinely used at Montpellier University Hospital Center in 52 patients with MM (M-CHU cohort).

Results: Results for total PC detection ($r^2=0.9965$; $P<0.001$; $n=52$) and malignant PC detection ($r^2=0.9486$; $P<0.001$; $n=38$) obtained with the two panels were significantly correlated. Moreover, comparison of the results obtained by automated detection with our software and by manual gating analysis in 80 BM samples (38 from the M-CHU cohort and 42 patients from another MM cohort) showed strong correlation for both total and malignant PC selection (respectively, $r^2=0.936$; $P<0.001$ and $r^2=0.9505$; $P<0.001$).

Conclusions: Our simple and automated strategy for MRD assessment in MM could help increasing reproducibility and productivity without compromising sensitivity and specificity, while decreasing the test cost.

Introduction

Multiple myeloma (MM) is a B cell neoplasia characterized by proliferation of a clone of malignant plasma cells (PC) in the bone marrow (BM). MM is the second most prevalent hematological malignancy and affects 20 000 new patients per year in the United States and also in Europe (1,2). Despite treatment improvements, MM remains an incurable disease in most patients with a median survival of 5-7 years (1). To evaluate the patient response, new criteria were added to the complete remission definition (negative immunofixation on the serum and urine, disappearance of any soft tissue plasmacytomas and $\leq 5\%$ PC in BM) (3). This more stringent definition of complete remission is based on PC characterization with molecular and

1
2
3 immunophenotypic techniques that increase sensibility and depth of detection (4,5).
4 Minimal residual disease (MRD), which indicates the malignant PC persistence after
5 treatment, leads to patient relapse. Different research groups reported that MRD
6 assessment by flow cytometry is a powerful tool to predict patient survival (6–9).
7 MRD was defined as the presence of 50 abnormal PC among 500 000 nucleated
8 cells (depth= 10^{-4}) in a BM sample (10). However, the development of next-generation
9 flow cytometry has decreased the limit of detection ($<0.001\%$) and increased the
10 depth of detection (10^{-5}) (4,11). The EuroFlow Consortium has developed a method
11 to standardize MRD assessment that combines specific reagents, a 8-color antibody
12 panel in two tubes and software specifically dedicated to flow cytometry analysis (12).
13 To improve MM diagnosis and MRD assessment, we have designed a simple 5-color
14 antibody panel (smart antibody panel, thereafter) in a single tube and the software
15 that allows the automatic PC detection from the flow cytometry analysis result files.
16 We then compared our smart antibody panel with the 7-color panel routinely used for
17 monitoring patients with MM at Montpellier University Hospital Center (France) (13).
18 Finally, we correlated the results obtained with our new automated PC detection
19 method with those obtained by manual detection using the FlowJo software in two
20 different cohorts of patients with MM.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **Materials and methods**

34 **Patient samples**

35
36 The Montpellier University Hospital Center (M-CHU) cohort included patients with
37 newly diagnosed MM (n=30) or MGUS (n=1) and 21 patients with MM after treatment
38 (total n=52). The HORIBA cohort included 30 patients with a monoclonal
39 gammopathy (26 MM and 4 MGUS) and 12 non-MM patients (2 with acute myeloid
40 leukemia, 2 with myelodysplastic syndrome and 8 with lymphoma) (total n=42) (Table
41 1). Bone marrow (BM) samples were obtained from all patients after signature of the
42 written informed consent in the framework of the study DataDiag 2012 (ID RCB:
43 2013-A00260-45; ANSM: 130293B-11), as approved by the ethics committee of
44 Montpellier University Hospital. BM samples from the M-CHU and HORIBA cohorts
45 were independently processed at the Montpellier University Hospital Center
46 laboratory and at the HORIBA Medical laboratory, respectively, by different
47 technicians and using different cytometers.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Supplementary information concerning methodology are included in Supplementary
4 experiment procedure.
5

6 **Results**

7 **Gating strategy**

8
9 The standard antibody panel, which is routinely used for MM MRD follow-up at
10 Montpellier University Hospital Center (France), allowed us to validate our new smart
11 antibody panel. The two gating strategies are described in Figure 1.
12
13

14 Total leukocyte selection (both methods): Contaminating events were removed on
15 both FCS and SSC plots (Figure 1A and 1B). Singlets were plotted on FSC/SSC
16 plots to remove debris and to select the total leukocyte population (Figure 1C).
17

18 Total PC selection: With the standard antibody panel, PC and B cells were selected
19 on CD45/CD38 and CD20/CD19 plots, respectively (Figure 1D). With the new smart
20 panel, CD38+/kappa+ and CD38+/lambda+ cells were directly selected on
21 CD38/kappa and CD38/lambda plots (Figure 1E). The total PC population
22 represented the "OR" Boolean gate between the kappa+ and lambda+ PC
23 populations. With both antibody panels, events eventually present on the
24 kappa/lambda diagonal were removed (Figure 1F and 1G) and the kappa+ and
25 lambda+ PC populations were selected for computing the lambda/kappa ratio.
26
27

28 Abnormal and normal PC discrimination: With the standard antibody panel, abnormal
29 PC were selected in four distinct tubes, based on the CD27, CD56, CD117 and
30 CD200 signals (Figure 1H). With the smart antibody panel, abnormal PC were
31 selected based on the positive and negative antibody pool signals (Figure 1I) (13).
32

33 **Panel comparison**

34 Total PC were selected on the CD45/CD38 plot with the standard antibody panel and
35 on the CD38/kappa and CD38/lambda plots with the smart antibody panel. As the
36 standard antibody panel included the smart panel antibodies used for total PC
37 detection (Tables 2 and 3), the FCS file generated by the standard antibody panel
38 was used to compare total PC selection, event-by-event, with the two antibody
39 panels in the whole M-CHU cohort (n=52). Analysis of the results for total PC
40 selection showed a strong correlation between smart and standard antibody panels
41 ($r^2=0.9965$; $P<0.001$) (Figure 2A). The Bland-Altman analysis highlighted a
42 systematic bias between methods [-939; 95% confidence interval: -4149 to 2271]
43 (Figure 2B). PC selection with the CD38/kappa and CD38/lambda plots resulted in a
44 better and clearer distinction between PC and total leukocytes than with the
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 CD45/CD38 plot. Furthermore, an event-by-event comparison using the standard and
4 smart antibody panels confirmed the strong correlation between the two panels for
5 total PC identification (Figure 2C).
6

7
8 To compare abnormal PC detection, 38 samples of the M-CHU cohort were analyzed
9 with the standard and then with the smart antibody panel. Comparison of the number
10 of abnormal PC detected with the standard panel (7-color panel, 4 tubes) and with
11 the smart panel (1 tube) showed a strong correlation ($r^2=0.9486$; $P<0.001$; $n=38$)
12 (Figure 2D).
13
14
15

16 **Automated and manual PC detection comparison**

17
18 Normal and abnormal PC detection in BM samples assessed with the smart antibody
19 panel ($n=38$ from the M-CHU cohort and $n=42$ from the HORIBA cohort; total $n=80$)
20 was automatically performed by our new software and compared with the results
21 obtained by manual gating selection. The results obtained with the automated and
22 manual gating strategies for total PC selection were strongly correlated when all
23 samples were taken into account ($r^2=0.936$; $P<0.001$; $n=80$), independently of the
24 instrument used, the LSRFortessa X20 ($r^2=0.965$; $P<0.001$; $n=42$) or the CyAn
25 Analyzer ($r^2=0.9593$; $P<0.001$; $n=38$) (Figure 3A). Similar results were obtained also
26 for abnormal PC selection ($r^2=0.9505$; $P<0.001$; $n=80$) (Figure 3B).
27
28
29
30
31
32

33 **Discussion**

34
35 Despite the development of molecular techniques, such as sequencing (14,15) and
36 polymerase chain reaction (16–20), multi-parametric flow cytometry remains the
37 reference method for MRD assessment because of its rapidity and ease of use and
38 low cost. Indeed, malignant PC are characterized by an aberrant immunophenotype
39 that allows their distinction from normal PC. The European Myeloma Network
40 recommends the use of CD45, CD38 and CD138 to distinguish PC from total
41 leukocytes and a minimum panel composed of CD19 and CD56 to discriminate
42 malignant from normal PC (10). A larger panel that includes CD117, CD20, CD28,
43 CD27, CD81 and CD200 allows the identification of additional abnormal PC (10,21–
44 24). The EuroFlow method, which is considered the standard method for MRD
45 assessment by flow cytometry, is composed of a 8-color panel with a common core
46 (CD38, CD138, CD45 and CD19) and eight markers divided in two tubes
47 (CD56/beta-2-microglobulin/kappa/lambda and CD27/CD28/CD81/CD117) (12).
48 More recently, 10-color and 14-color panels in a single tube have been proposed to
49 increase the efficiency/cost ratio (4). In our simpler smart antibody panel, we decided
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 to remove the CD138 marker given its lability after sampling (25,26) and to use
4 CD38, kappa and lambda light-chain, instead of CD38 and CD45, to select total PC.
5
6 The combination between CD38 and light-chain markers is usually not used to select
7 total PC. Nakayama and colleagues employed a similar strategy to select PC in
8 samples from patients with MM at diagnosis. Specifically, they first gated cells on the
9 SSC/CD38 dimensions and then selected PC on the kappa/CD138 and
10 lambda/CD138 dimensions (27). These three markers allow a better and clearer
11 distinction of PC than the use of CD38 and CD45 (Figure 1). Kappa and lambda light-
12 chains are mainly expressed by PC and B cells, while CD45 (the leucocyte common
13 antigen) is expressed in a larger cell population (28) and its expression is
14 heterogeneous in PC (22). However, this simpler panel presents two drawbacks. The
15 first limitation is the use of antibodies against kappa and lambda light-chains that
16 does not allow the identification of PC in patients with non-secretory MM (less than
17 3% of all patients with MM) (29). The second limitation is linked to the use of new
18 targeted treatments with monoclonal antibodies. The combination of chemotherapy
19 drugs and monoclonal antibodies, such as rituximab (anti-CD20), elotuzumab (anti-
20 CS1) or daratumumab (anti-CD38), is currently evaluated in phase 2 and 3 clinical
21 trials (30–32). A previous report showed that malignant PC in patients with relapsed
22 refractory MM treated with daratumumab can lose CD38 expression (33) and this
23 could influence the results of MRD monitoring methods that include detection of the
24 CD38 marker. To address the problem of identifying PC in patients with MM who are
25 treated with anti-CD38 molecules, new CD38 antibodies have been developed to
26 detect a CD38 multi-epitope (Cytognos, Salamanca, Spain) or intracellular CD38.
27 Moreover, new surface antigens, such as CD229 (Ly9), CD269 (TNFRSF17/BCMA)
28 and CD319 (SLAMF7/CS1), could be used to characterize PC (25,34,35).

29
30
31 In the last few years, several computational methods of automated cell detection from
32 flow cytometry data have been developed, for example ADICyt (commercially
33 available from Adinis Ltd., Slovakia), FLOW Clustering without K (FLOCK) (36), and R
34 packages such as flowMeans (37), flowClust/merge (38,39), FLAME (40) and
35 SamSPECTRAL (41). The algorithm of our non-supervised and C source software is
36 simple: total PC were selected after a rotation and valley search between
37 populations, and abnormal PC were identified thanks to the lambda/kappa ratio and
38 internal controls. These internal controls have been already used in MM flow
39 cytometry studies (11,42) to define the threshold between normal and malignant PC
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 and to avoid the inclusion of additional tubes for isotype controls. The strong
4 correlation between the results obtained by automated detection and by manual
5 gating for both total and abnormal PC demonstrates the reliability of our method.
6 Indeed, the software was used and validated in two cohorts of patients with different
7 hematological malignancies (68 MM in total and 12 non-MM malignancies used as
8 negative controls). The BM samples of the two independent cohorts were analyzed in
9 different laboratories by different personnel and using two different cytometers, the
10 LSRFortessa X20 (Becton Dickinson) and the CyAn ADP Analyzer (Beckman
11 Coulter). The efficient automated PC detection in MM samples with this method could
12 represent a model applicable to other malignancies.
13

14
15
16 Finally, this complete solution that integrates pre-analytical and post-analytical steps
17 has several advantages. The use of antibody pools allows the identification of PC as
18 efficiently as the reference method by using the same number of markers (CD19,
19 CD27, CD56, CD117 and CD200), while decreasing the number of fluorophores.
20 Therefore, the cytometer cost, mostly driven by the number of light sources, can be
21 considerably reduced by using a 5-color panel that requires only one blue laser.
22 Moreover, replacing several tubes with a single tube decreases the reagent quantity
23 used (washing, permeabilization and fixation reagents), makes easier and faster the
24 handling, and produces a unique result file after flow cytometry analysis. Lastly, our
25 automated PC detection software significantly reduces data analysis time and
26 increases reproducibility. Indeed, results obtained with manual gating rely on a
27 subjective analysis and this can generate inter and intra-analyst differences. It would
28 be interesting to compare our automated software with other computational methods
29 (43,44).
30

31
32
33 In conclusion, the complete solution that we have developed significantly decreases
34 processing and analysis time as well as test cost, increases productivity and, most
35 importantly, can be used in non-specialized laboratories. We now need to
36 standardize this solution in other centers.
37

38 **Acknowledgments**

39 This work was supported by BPI France in the frame of the DataDiag project.
40

41 **References**

- 42 1. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple
43 myeloma. *Lancet*. 2009 Jul 25;374(9686):324–39.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
2. Teitelbaum A, Ba-Mancini A, Huang H, Henk HJ. Health Care Costs and Resource Utilization, Including Patient Burden, Associated With Novel-Agent-Based Treatment Versus Other Therapies for Multiple Myeloma: Findings Using Real-World Claims Data. *The Oncologist*. 2013 Jan 1;18(1):37–45.
 3. Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006 Jul 20;20(9):1467–73.
 4. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016 Aug;17(8):e328–46.
 5. Landgren O, Owen RG. Better therapy requires better response evaluation: Paving the way for minimal residual disease testing for every myeloma patient. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016 Jan 1;90(1):14–20.
 6. Paiva B, Vidriales M-B, Cerveró J, Mateo G, Pérez JJ, Montalbán MA, et al. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):4017–23.
 7. Paiva B, Chandia M, Puig N, Vidriales M-B, Perez JJ, Lopez-Corral L, et al. The prognostic value of multiparameter flow cytometry minimal residual disease assessment in relapse multiple myeloma. *Haematologica* [Internet]. 2014 Nov 7 [cited 2014 Nov 17]; Available from: <http://www.haematologica.org/content/early/2014/11/03/haematol.2014.115162.full-text.pdf+html>
 8. Paiva B, Chandia M, Puig N, Vidriales M-B, Perez JJ, Lopez-Corral L, et al. The prognostic value of multiparameter flow cytometry minimal residual disease assessment in relapsed multiple myeloma. *Haematologica*. 2015 Feb 1;100(2):e53–5.
 9. Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, Davies FE, Gregory WM, Bell SE, et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Jul 10;31(20):2540–7.
 10. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008 Mar;93(3):431–8.
 11. Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016 Jan;90(1):31–9.
 12. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012 Sep;26(9):1908–75.

13. Caraux A, Vincent L, Bouhya S, Quittet P, Moreaux J, Requirand G, et al. Residual malignant and normal plasma cells shortly after high dose melphalan and stem cell transplantation. Highlight of a putative therapeutic window in Multiple Myeloma? *Oncotarget*. 2012 Nov;3(11):1335–47.
14. Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, Ferrero S, Pepin F, Drandi D, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*. 2014 Jun;28(6):1299–307.
15. Martínez-Lopez J, Lahuerta JJ, Pepin F, González M, Barrio S, Ayala R, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood*. 2014 May 15;123(20):3073–9.
16. Martínez-Lopez J, Fernández-Redondo E, García-Sánchez R, Montalbán MA, Martínez-Sánchez P, Pavia B, et al. Clinical applicability and prognostic significance of molecular response assessed by fluorescent-PCR of immunoglobulin genes in multiple myeloma. Results from a GEM/PETHEMA study. *Br J Haematol*. 2013 Dec;163(5):581–9.
17. Puig N, Sarasquete ME, Balanzategui A, Martínez J, Paiva B, García H, et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia*. 2014 Feb;28(2):391–7.
18. Putkonen M, Kairisto V, Juvonen V, Pelliniemi T-T, Rauhala A, Itälä-Remes M, et al. Depth of response assessed by quantitative ASO-PCR predicts the outcome after stem cell transplantation in multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2010 Nov;85(5):416–23.
19. Sarasquete ME, García-Sanz R, González D, Martínez J, Mateo G, Martínez P, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica*. 2005 Oct;90(10):1365–72.
20. Silvennoinen R, Lundan T, Kairisto V, Pelliniemi T-T, Putkonen M, Anttila P, et al. Comparative analysis of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry and enhanced ASO RQ-PCR in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2014 Oct;4(10):e250.
21. Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, Perez JJ, Böttcher S, Wind H, et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016 Jan 1;90(1):61–72.
22. Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, Sharma A, Jain P. Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2009 Nov;132(5):728–32.
23. Kumar S, Kimlinger T, Morice W. Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Sep;23(3):433–51.
24. Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M, Mateo G, López A, Rasillo A, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010 Jul;78(4):239–52.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
25. Frigyesi I, Adolfsson J, Ali M, Christophersen MK, Johnsson E, Turesson I, et al. Robust isolation of malignant plasma cells in multiple myeloma. *Blood*. 2014 Jan 2;blood-2013-09-529800.
26. Lin P, Owens R, Tricot G, Wilson CS. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2004 Apr;121(4):482–8.
27. Nakayama S, Yokote T, Hirata Y, Iwaki K, Akioka T, Miyoshi T, et al. An approach for diagnosing plasma cell myeloma by three-color flow cytometry based on kappa/lambda ratios of CD38-gated CD138(+) cells. *Diagn Pathol*. 2012;7:131.
28. Raja KRM, Kovarova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *Br J Haematol*. 2010 May;149(3):334–51.
29. Lonial S, Kaufman JL. Non-secretory myeloma: a clinician's guide. *Oncol Williston Park N*. 2013 Sep;27(9):924–8, 930.
30. Donato F, Gay F, Brinthen S, Troia R, Palumbo A. Monoclonal antibodies currently in Phase II and III trials for multiple myeloma. *Expert Opin Biol Ther*. 2014 Apr 21;1–18.
31. van de Donk NWCJ, Kamps S, Mutis T, Lokhorst HM. Monoclonal antibody-based therapy as a new treatment strategy in multiple myeloma. *Leukemia*. 2012 Feb;26(2):199–213.
32. Zagouri F, Terpos E, Kastritis E, Dimopoulos MA. Emerging antibodies for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2016 Jun;21(2):225–37.
33. Ise M, Matsubayashi K, Tsujimura H, Kumagai K. Loss of CD38 Expression in Relapsed Refractory Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016 May 1;16(5):e59–64.
34. Muccio VE, Saraci E, Gilestro M, Gattei V, Zucchetto A, Astolfi M, et al. Multiple myeloma: New surface antigens for the characterization of plasma cells in the era of novel agents. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016 Jan;90(1):81–90.
35. Pojero F, Flores-Montero J, Sanoja L, Pérez JJ, Puig N, Paiva B, et al. Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016 Jan;90(1):91–100.
36. Qian Y, Wei C, Eun-Hyung Lee F, Campbell J, Halliley J, Lee JA, et al. Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78 Suppl 1:S69-82.
37. Aghaeepour N, Nikolic R, Hoos HH, Brinkman RR. Rapid cell population identification in flow cytometry data. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2011 Jan;79(1):6–13.
38. Finak G, Bashashati A, Brinkman R, Gottardo R. Merging mixture components for cell population identification in flow cytometry. *Adv Bioinforma*. 2009;247646.

39. Lo K, Brinkman RR, Gottardo R. Automated gating of flow cytometry data via robust model-based clustering. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2008 Apr;73(4):321–32.
40. Pyne S, Hu X, Wang K, Rossin E, Lin T-I, Maier LM, et al. Automated high-dimensional flow cytometric data analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 26;106(21):8519–24.
41. Zare H, Shooshtari P, Gupta A, Brinkman RR. Data reduction for spectral clustering to analyze high throughput flow cytometry data. *BMC Bioinformatics*. 2010 Jul 28;11:403.
42. Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, Lin P, Jorgensen JL, Orfao A, et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016 Jan;90(1):26–30.
43. Aghaeepour N, Finak G, Consortium TF, Consortium TD, Hoos H, Mosmann TR, et al. Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat Methods*. 2013 Mar;10(3):228–38.
44. Verschoor CP, Lelic A, Bramson JL, Bowdish DME. An Introduction to Automated Flow Cytometry Gating Tools and Their Implementation. *Front Immunol [Internet]*. 2015 Jul 27 [cited 2016 Nov 22];6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4515551/>

Figure Legend

Figure 1: Manual gating strategy using the standard and smart antibody panels. Singlets are selected on FSC (A) and SSC (B) plots and total leukocytes on FSC/SSC plots (C). PC and B cells are selected on CD45/CD38 and CD20/CD19 plots with the standard antibody panel, (D), whereas PC are selected on CD38/kappa and CD38/lambda plots with the smart antibody panel (E). Events on the kappa/lambda diagonal are removed in both systems (panel F for the standard and panel G for the smart antibody panel). Abnormal PC are selected on the CD27, CD56, CD117 and CD200 dimensions (H) using the standard antibody panel and on the negative and positive pool dimensions (I) using the smart antibody panel.

Figure 2: Comparison of normal and malignant PC selection using the standard and smart antibody panels. A: Correlation of the results for total PC selection obtained using the two panels and the M-CHU cohort (n=52; $r^2=0.9966$; $P<0.001$). B: Evaluation of the bias between methods using the Bland-Altman analysis. C: Comparison of total PC classification, event-by-event. D: Correlation of the results obtained for abnormal PC selection using the smart and standard antibody panels in 38 BM samples from the M-CHU cohort ($r^2=0.9486$; $P<0.001$).

Figure 3: Automated and manual gating comparison. A: Correlation of the results obtained for total PC detection with the automated method and by manual gating using the HORIBA cohort samples (n=42) and the LSRFortessa X20 cell analyzer (Becton Dickinson) (blue) ($r^2=0.965$; $P<0.001$), the M-CHU cohort samples (n=38) and the CyAn ADP analyzer (Beckman Coulter) (red) ($r^2=0.9593$; $P<0.001$) and both cohort samples (blue and red) ($r^2=0.936$; $P<0.001$). B: Correlation of the results

obtained for abnormal PC detection with the automated method and by manual gating using the HORIBA cohort samples ($r^2=0.987$; $P<0.001$), M-CHU cohort samples ($r^2=0.9451$; $P<0.001$) and both cohort samples ($r^2=0.9505$; $P<0.001$).

| Hematological malignancies | M-CHU cohort | HORIBA cohort |
|----------------------------|--------------|---------------|
| Monoclonal gammopathy | 52 | 30 |
| Newly diagnosed MM | 30 | 26 |
| Newly diagnosed MGUS | 1 | 4 |
| MRD follow-up | 21 | - |
| Other malignancies | - | 12 |
| Acute myeloid leukemia | - | 2 |
| Myelodysplastic syndrome | - | 2 |
| Lymphoma | - | 8 |

Table 1: Hematological malignancies of the patients included in the Montpellier University Hospital Center (M-CHU) and HORIBA cohorts. Abbreviations: MM, Multiple Myeloma; MGUS, Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance; MRD, Minimal Residual Disease.

| Fluorophores Tubes | FITC | PE | PE- CF594 | APC | PerCP- Cy5.5 | APC- AF750 | PE-Cy7 |
|-----------------------|--------|-------|--------------|-------|-----------------|---------------|--------|
| 1 | | | | CD27 | | | |
| 2 | Lambda | Kappa | CD19 | CD56 | CD38 | CD20 | CD45 |
| 3 | | | | CD117 | | | |
| 4 | | | | CD200 | | | |

Table 2: Standard antibody panel composition. The 7-color panel requires four tubes that contain a common antibody core composed of anti-lambda, anti-kappa, anti-CD19, anti-CD38, anti-CD20 and anti-CD45 antibodies and four antibodies (one in each tube) against specific markers (CD27, CD56, CD117 and CD200) of malignant PC.

| Fluorophores Tube | FITC | PE | PE-CF594 | PerCP- Cy5.5 | PE-Cy7 |
|----------------------|--------|--|----------|-----------------|--------------------------------------|
| 1 | Lambda | Positive pool CD56 CD117 CD200 | Kappa | CD38 | Negative pool CD19 CD27 |

Table 3: Smart antibody panel composition. The 5-color panel requires one single tube that contains anti-CD38, anti-kappa, anti-lambda antibodies, a positive antibody

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

pool against markers that are overexpressed in malignant PC (CD56, CD117 and CD200) and a negative antibody pool against markers that are downregulated in malignant PC (CD19 and CD27).

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

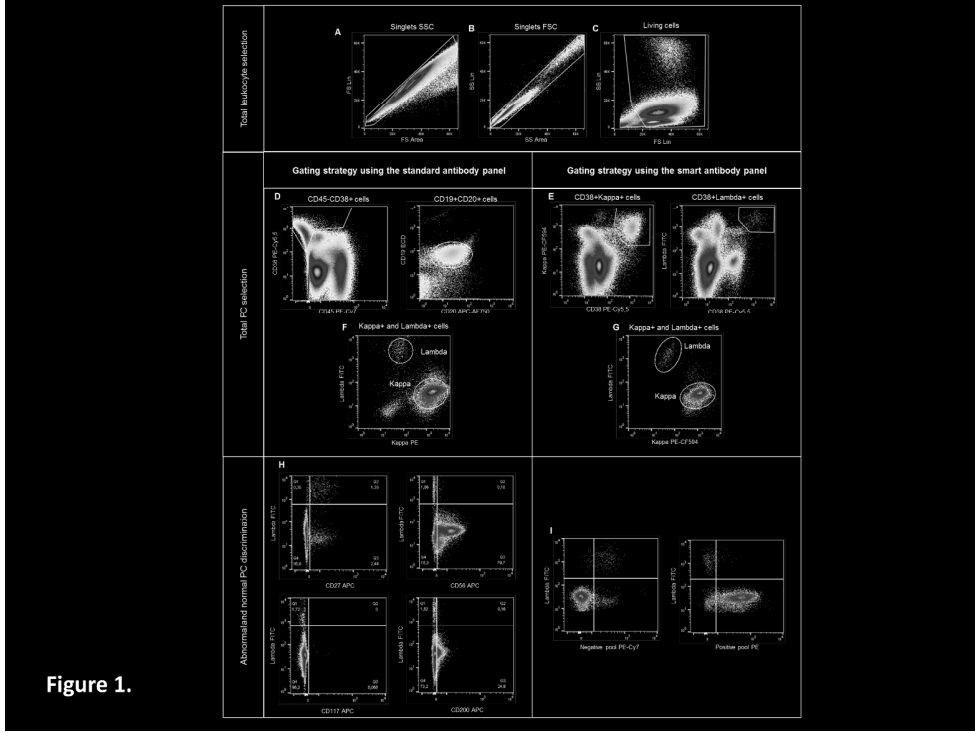


Figure 1.

Figure 1

269x202mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

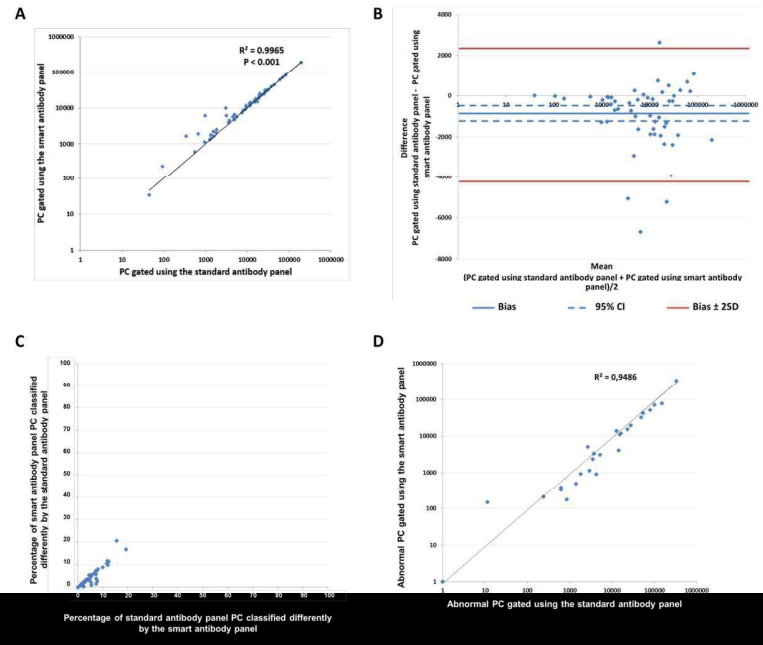


Figure 2.

Figure 2

269x202mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

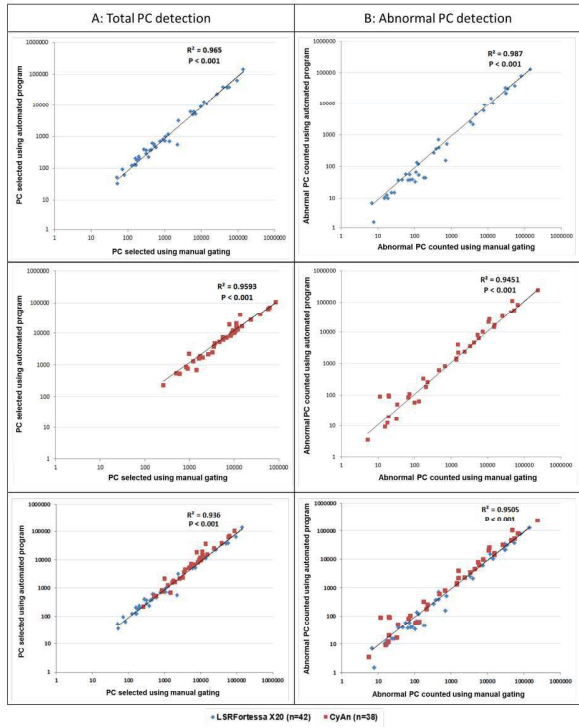


Figure 3.

Figure 3

269x202mm (300 x 300 DPI)

Flow cytometry

BM aspirates were harvested in heparin-containing syringes. Samples were filtered through a 100 μm filter to remove bone debris. To lyse red blood cells, samples were incubated with a 4-fold volume excess of ammonium chloride for 20 minutes. Then, leukocytes were washed and incubated in phosphate buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Dorset, United Kingdom) containing 10% goat serum albumin (PAA Laboratories, Paris, France) for 10 minutes as blocking step. Two antibody panels were used to identify PC: the panel routinely used at the Montpellier University Hospital Center, as reference (standard antibody panel, thereafter) (13), and our new smart antibody panel. For leukocyte labeling, the standard antibody panel (four tubes) includes a common antibody core composed of 10 μL of anti-CD38-phycoerythrin/cyanin 5.5 (PerCP/Cy5.5) (Beckman Coulter, Miami, US), 5 μL of anti-CD45-PE/Cy7 (Beckman Coulter), 10 μL of anti-CD19-PE/CF594 (Beckman Coulter) and 10 μL of anti-CD20-allophycocyanin/Alexa Fluor 750® (APC/AF750) (Beckman Coulter) antibodies. In addition, each of the four tubes contains one of the following: 5 μL of anti-CD27-APC (BD Biosciences, Oxford, United Kingdom), 10 μL of anti-CD56-APC (Beckman Coulter), 10 μL of anti-CD117-APC (Beckman Coulter) or 5 μL of anti-CD200-APC (BioLegend, San Diego, US) (Table 2). On the other hand, for leukocytes labeling, the smart panel includes 10 μL of anti-CD38-PE/Cy5.5 (Beckman Coulter), a positive antibody pool (against markers that are overexpressed in malignant PC) composed of 10 μL of anti-CD56-PE (Beckman Coulter), 10 μL of anti-CD117-PE (Beckman Coulter) and 20 μL of anti-CD200-PE (BD Biosciences), and a negative antibody pool (against markers downregulated in malignant PC) composed of 10 μL of anti-CD19-PE/Cy7 (Beckman Coulter) and 10 μL of anti-CD27-PE/Cy7 antibodies (Beckman Coulter) (Table 3). After labeling, leukocytes were fixed, washed twice in PBS and permeabilized with the IntraPrep Kit (Beckman Coulter). Leukocytes were then incubated with 20 μL of anti-kappa-PE (BD Biosciences) and 20 μL of anti-lambda-FITC antibodies (BD Biosciences) when using the standard antibody panel, and with 5 μL of anti-kappa-PE/CF594 (BD Biosciences) and 20 μL of anti-lambda-FITC antibodies (BD Biosciences) when using the smart antibody panel. Cells were washed twice in PBS before flow cytometry analysis.

The signal of 50,000 to 5,000,000 cells was acquired using a Beckman Coulter CyAn ADP Analyzer (Beckman Coulter) and the Summit v4.3 (Beckman Coulter) acquisition software at the Montpellier University Hospital Center, or a Becton

1
2
3 Dickinson FACS LSRFortessa X20 apparatus (BD Biosciences) and the FACSDIVA
4 v8 (BD Biosciences) acquisition software at the HORIBA medical laboratory. Flow
5 cytometry results were analyzed using the FlowJo software, v.10.1 (Ashland, Oregon,
6 US).
7
8

9 All BM samples from the M-CHU cohort (n=52) were analyzed using the standard
10 antibody panel. However, due to the limited sample volume, only 38 of these samples
11 (73%) could also be assessed using the smart antibody panel. Samples from the
12 HORIBA cohort (n=42) were only analyzed with the smart antibody panel.
13
14
15

16 **Automated PC detection**

17 We developed a C source software tool that automatically detects normal and
18 malignant PC from flow cytometry data obtained using the smart antibody panel. This
19 software recovers data from the FSC file of each sample. The software associates
20 the values of all flow cytometry parameters with each event analyzed through the
21 flow cell and generates a matrix composed of N events x P parameter values. For
22 each cytometer (hospital and HORIBA laboratory), specific parameters were
23 automatically initialized in the software, such as scales, coordinate values of fixed
24 gates, rotation angles and bi-exponential scale parameters.
25
26
27
28
29
30

31 For leukocyte selection, singlets were automatically selected from FSC and SSC
32 plots after anti-clockwise rotation. For all events, the width and area values of the
33 FSC parameter were recovered and plotted on linear two-dimensional graphs. Then,
34 x and y values were transformed using anti-clockwise rotation, according to the
35 following formulas: $x' = \cos(\theta) * (x - xc) - \sin(\theta) * (y - yc) + xc$ and $y' = \sin(\theta) *$
36 $(x - xc) + \cos(\theta) * (y - yc) + yc$, where θ is the angle and $(x; y)$, $(x'; y')$ and $(xc; yc)$
37 are the non-transformed value, transformed value and rotation center coordinates,
38 respectively. The x' values were projected on a histogram and events present on the
39 edges of the Gaussian curve were removed, while the other events represented the
40 FSC singlet population. Linear and area values of the SSC parameter from this
41 population were recovered and transformed using the same rotation. The SSC singlet
42 population was selected according to the same process. Linear values of SSC and
43 FSC parameters from SSC singlets were plotted on two-dimensional graphs and a
44 fixed gate was used to select the total leukocyte population.
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 For total PC selection, the kappa and CD38 values from the leukocyte population
55 were recovered and transformed according to a logarithmic scale and a clockwise
56 rotation. x' values were inserted in a histogram and the software recursively
57
58
59
60

1
2
3 searched for every valley that separated populations. For the first iteration, the
4 population that expressed stronger CD38 and kappa signals was selected, and
5 events were plotted on a kappa/lambda matrix. If too many events occurred on the
6 kappa/lambda diagonal, the software analyzed the population separated by the next
7 valley until it found the last kappa population. In parallel, the lambda population was
8 selected on the lambda and CD38 dimensions using the same approach. Both
9 populations were then combined in a Boolean gate ("OR" gate). Kappa/lambda
10 double positive events were removed from the kappa/lambda matrix, and the kappa-
11 and lambda-positive PC populations were selected through fixed gates. Both
12 populations represented the total PC population.

13
14 For abnormal and normal PC discrimination, the ratio between lambda- and /kappa-
15 positive cells (lambda/kappa ratio) was calculated to find potential abnormal PC
16 populations. The normal ratio ranged between 0.26 and 1.65 (45); a ratio lower than
17 0.26 was indicative of a kappa-positive clonal population, and above 1.65 of a
18 lambda-positive clonal population. The limit between normal and abnormal cells on
19 pool dimensions was defined according to the median of the normal PC population in
20 the case of abnormal ratio, or according to the median of the total PC population in
21 the case of normal ratio. To compute the median value, the positive or negative pool
22 values of the population of interest were recovered and transformed according to a
23 bi-exponential scale (46). The median value was calculated from the transformed
24 values and the threshold was settled to the median plus a variable value for the
25 positive pool dimension or minus a variable value for the negative pool dimension.
26 For the positive antibody pool, PC events above the threshold were classified as
27 abnormal, while for the negative antibody pool, PC events below the threshold were
28 classified as abnormal.

29
30 All population identifications can be checked on dot plots or graphs using R v3.3.0
31 with the MASS and ggplot2 packages.

32 **Comparison of antibody panels and cell detection methods**

33
34 The antibody panels were compared using the 38 BM samples from the M-CHU
35 cohort that could be analyzed with both panels. Moreover, as the standard antibody
36 panel includes all the smart panel antibodies used for total PC detection (Tables 2
37 and 3), total PC detection using both panel markers could be compared from the
38 same FCS file generated by the standard panel analysis (n=52 samples from the
39 CHU cohort). The software we developed can recover manual gating data that
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 support the flow cytometry file analysis from Mac OS and Windows FlowJo versions.
4 Manual gating of the two methods was reproduced to classify each event in distinct
5 populations. After gating, each event classification was compared. Automated cell
6 detection and manual gating were also compared in BM samples processed using
7 the smart antibody panel (M-CHU cohort, n=38; HORIBA cohort, n=42).

11 **Statistical analysis**

12 The Pearson correlation coefficient was used to establish correlations between the
13 results obtained with the standard and smart antibody panels and the automated cell
14 detection method and manual gating. A Bland-Altman analysis (47) was also used to
15 determine the agreement or bias in total PC selection using the standard and new
16 method. A P-value lower than to 0.05 was considered significant for all tests.
17
18
19
20
21

- 22
23 45. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, Melton LJ, Bradwell AR, Clark RJ, et al.
24 Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in
25 monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2005 Aug
26 1;106(3):812–7.
27
28 46. Parks DR, Roederer M, Moore WA. A new 'Logicle' display method avoids
29 deceptive effects of logarithmic scaling for low signals and compensated data.
30 *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2006 Jun;69(6):541–51.
31
32 47. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two
33 methods of clinical measurement. *Lancet Lond Engl*. 1986 Feb 8;1(8476):307–10.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Résultats préliminaires

Automatisation de la préparation d'un échantillon biologique analysé en CFM

Ces résultats se décomposent en deux études. La première étude vise à optimiser le protocole de préparation manuelle des échantillons de moelle osseuse afin de faciliter l'automatisation de la préparation. La seconde étude concerne le développement d'un préparateur d'échantillons biologiques (sang ou moelle) dédié à l'analyse en CFM.

Etude 1 : Optimisation du protocole de préparation manuelle d'un échantillon de moelle osseuse

Les protocoles de préparation des échantillons de moelle osseuse de patients atteints de MM dédiés à l'analyse en CFM sont longs et complexes. Ils comprennent principalement une lyse érythrocytaire, un marquage des protéines membranaires, suivi de la fixation des leucocytes, puis de la perméabilisation de ces derniers, et enfin du marquage des protéines intracytoplasmiques. Le but de cette étude est d'optimiser les étapes du protocole initial (*Figure 21*) pour réduire le temps de travail du technicien et du test tout en conservant la même efficacité.

Dans un premier temps, nous avons comparé deux lyses d'intérêt en termes de rapidité et d'efficacité lytique. Nous avons également vérifié que ces lyses n'altéraient pas les GB. Dans un second temps, nous avons évalué la fluorescence de l'ensemble des Ac de surface de notre panel (CD19, CD27, CD38, CD56, CD117 et CD200) dans différentes conditions.

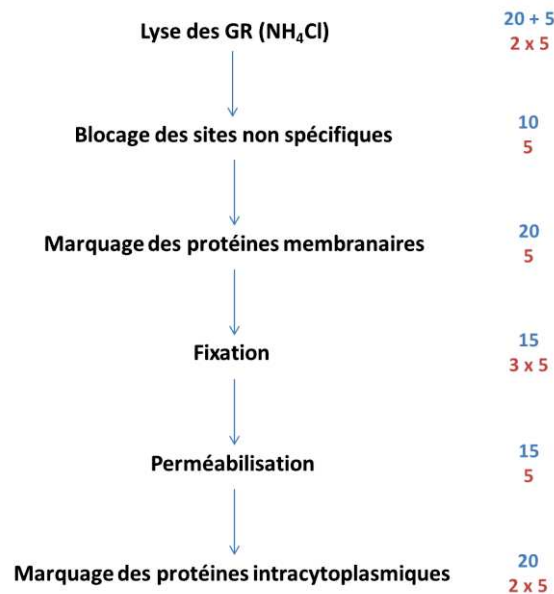


Figure 21 : Différentes étapes du protocole de préparation d'un échantillon de moelle osseuse comprenant les temps d'incubation (en bleu) et les temps de lavage par centrifugation (en rouge).

Le temps total nécessaire à ce protocole est de 2h35min.

1. Lyse érythrocytaire

La lyse des GR permet de limiter le marquage des protéines membranaires et intracytoplasmiques aux leucocytes, réduisant ainsi le volume des Ac nécessaire et diminuant le coût du test. De plus, le suivi de la MRD requiert la détection d'une population rare au sein des leucocytes, les plasmocytes (normaux et tumoraux). Il est donc important de lyser les érythrocytes pour éviter qu'ils ne saturent le signal lors de l'analyse. Le processus de déplétion des érythrocytes doit être rapide mais ne doit pas modifier la conformation membranaire des leucocytes. La lyse la plus communément utilisée en cytométrie est la lyse au NH₄Cl. C'est une lyse lente (une dizaine de minutes) qui cible préférentiellement les GR mais qui altère les leucocytes à long terme. HORIBA Medical utilise dans ses réactifs de lyse de la saponine, un tensioactif, qui va créer très rapidement (de quelques secondes à quelques minutes) des trous dans les membranes cellulaires en formant des liaisons avec le cholestérol. Afin de conserver l'intégrité des leucocytes, ces réactifs comprennent également des agents fixant, notamment du glutaraldéhyde. Ce type d'aldéhydes n'est pas ou peu utilisé pour fixer les cellules en cytométrie car les ponts formés entre les protéines sont trop importants ce qui diminue l'efficacité des marquages des protéines cibles. Pour combiner la rapidité de la saponine et l'efficacité du formaldéhyde pour fixer et protéger les leucocytes, un autre réactif de lyse utilisé en interne a été formulé (saponine, PFA, EDTA, NaN₃, propanediol).

Cette formule et la lyse NH_4Cl ont été comparées en termes d'efficacité et de vitesse d'action sur 20 minutes (*Figure 22*). Chaque échantillon sanguin ($n=4$) a été analysé sur un Yumizen H500 (HORIBA Medical) avant la lyse puis toutes les 5 minutes pendant la lyse pour dénombrer les évènements présents dans le canal des GR, des GB et des PLT. Pour évaluer les deux lyses d'intérêt, le réactif de lyse de l'automate est retiré et remplacé par du PBS pour empêcher la lyse érythrocytaire effectuée lors du comptage normal des GB.

Il semblerait que la lyse des GR soit très rapide avec la lyse saponine et plus lente avec la lyse NH_4Cl (*Figure 22A*). Dans le canal GB de l'automate, une très forte augmentation de la concentration des évènements est observée avec la lyse NH_4Cl alors que la lyse saponine provoque une légère augmentation de cette dernière à T5min avant que la concentration des évènements du canal GB diminue puis se stabilise (*Figure 22B*). La forte concentration des évènements du canal GB avec la lyse NH_4Cl peut s'expliquer par le fait que les GR ne sont pas lysés et sont comptés comme des GB en l'absence du réactif de lyse de l'automate, de même pour la lyse saponine à T5min où tous les GR ne sont pas encore lysés. A l'inverse, la lyse saponine provoque une forte augmentation de la concentration des évènements du canal des PLT contrairement à la lyse NH_4Cl qui n'entraîne qu'une légère hausse de ce type d'évènements (*Figure 22C*). Cette observation peut s'expliquer par la solubilisation de la membrane érythrocytaire par la saponine qui génère des fragments détectables dans le canal des PLT. Il semblerait que les deux lyses aient un mode de fonctionnement différent. La lyse à base de saponine crée de grands trous dans la membrane érythrocytaire grâce aux liaisons avec le cholestérol formant des micelles et conduisant ainsi à la solubilisation totale des GR (Schreier et al., 2000). La lyse NH_4Cl quant à elle, provoque le gonflement puis l'éclatement des cellules (Chernyshev et al., 2008). Ce dernier processus est plus lent que la solubilisation par des tensioactifs (Manaargadoo-Catin et al., 2016). Une observation au microscope des sangs lysés à T20min a montré l'absence de GR en utilisant la lyse à base de saponine tandis qu'avec la lyse NH_4Cl , des « ghosts » de GR de taille équivalente étaient présents confirmant ainsi les résultats obtenus avec le Yumizen H500. De plus, cette même observation a montré que les deux types de lyse ne modifiaient pas la conformation membranaire des GB (absence de déformation).

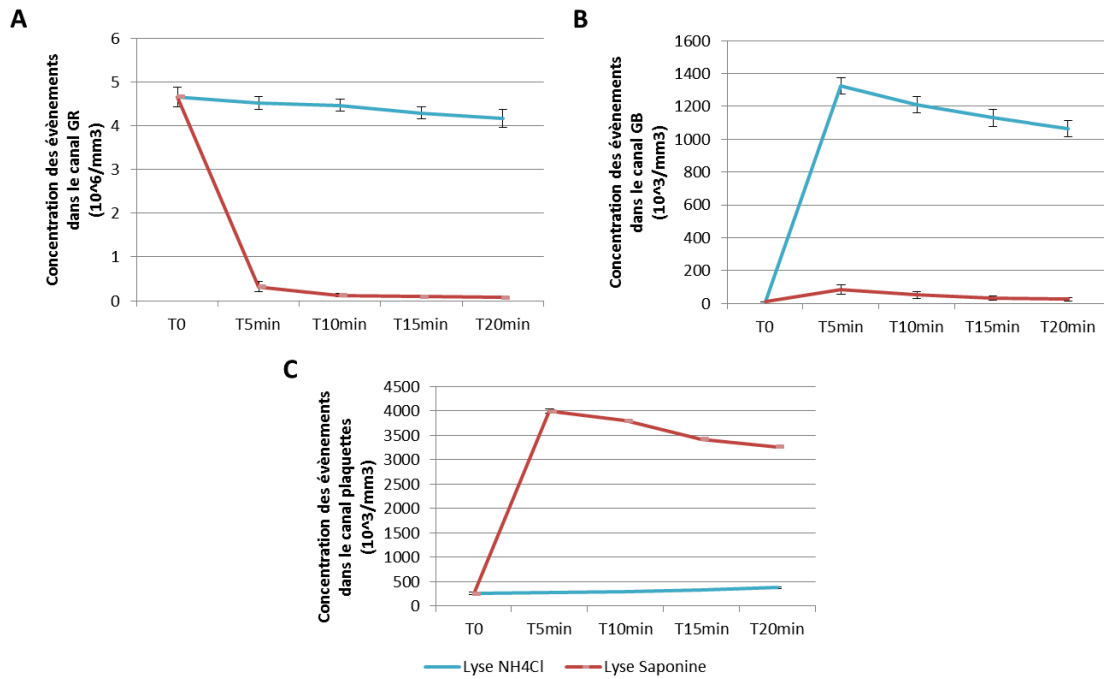


Figure 22 : Comparaison de la lyse NH₄Cl et de la lyse à base de saponine.

Dénombrement à l'aide d'un Yumizen H500 (A) des GR, (B) des GB et (C) des PLT d'échantillons sanguins (n=4) lors de la lyse érythrocytaire.

La formule à base de saponine semble être plus rapide et plus efficace pour lyser les GR. De plus, il semblerait que cette formule lytique n'altère pas les GB à 20min (Figure 22B). Pour confirmer ce résultat, les échantillons ont été conservés 20h à 4°C dans la lyse à base de saponine avant d'être analysés sur le Yumizen H500 (Figure 23). A T20h, plus de 98% des GR sont lysés alors que la concentration en GB reste stable. L'intégrité des leucocytes est préservée grâce au formaldéhyde de la formulation.

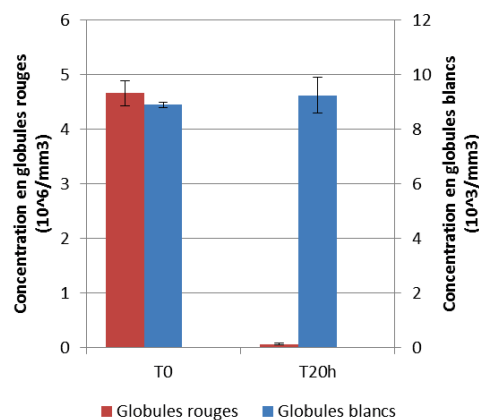


Figure 23 : Préservation des GB et lyse totale des GR à T20h avec la lyse à base de saponine (n=4)

2. Immunophénotypage

Notre panel comprend 5 Ac dirigés contre des protéines de surface (CD19, CD27, CD38, CD56, CD117, et CD200) et 2 Ac dirigés vers des protéines intracytoplasmiques (kappa et lambda). Le marquage des protéines de surface est généralement réalisé avant la fixation et la perméabilisation car ces étapes peuvent altérer la conformation des protéines membranaires (changement de la structure 3D, clivage). A l'inverse, le marquage des protéines intracellulaires nécessite que les cellules soient fixées puis perméabilisées pour que les Ac puissent atteindre leur cible. L'utilisation d'un cocktail sous forme liquide ou lyophilisé composé des Ac des protéines membranaires et intracellulaires pourrait réduire considérablement le nombre de manipulations réalisées par le technicien et par conséquent le temps nécessaire à l'immunophénotypage. Le marquage avec ce cocktail devant être réalisé sur des cellules fixées et perméabilisées, nous avons d'abord vérifié que les agents fixateur et perméabilisant n'altéraient pas les sites antigéniques des protéines de surface.

Les plasmocytes d'un échantillon de moelle osseuse n'exprimant pas l'ensemble des marqueurs ciblés par notre panel, des lignées plasmocytaires ou de lymphocytes B ont été utilisées pour évaluer l'intensité de fluorescence de chaque Ac dans différentes conditions. Des résultats de puces affymetrix (Moreaux et al., 2011) ont permis de cibler des lignées cellulaires (plasmocytaires ou de cellules B) exprimant fortement les Ag d'intérêt (

Tableau VIII). Seule l'intensité de fluorescence de la protéine CD117 a été suivie à partir d'un échantillon médullaire.

Tableau VIII : Lignées cellulaires sélectionnées pour le suivi de l'intensité de fluorescence des Ac de notre panel

| Marqueurs | Lignées cellulaires |
|-----------|-------------------------------|
| CD19 | DOHH2 (lymphocytes B) |
| CD27 | XG19 (plasmocytes) |
| CD38 | LP1 (plasmocytes) |
| CD56 | OPM2 (plasmocytes) |
| CD200 | LP1 transformée (plasmocytes) |

a. Fixation

Les intensités de fluorescence des Ac dirigés vers les protéines de surface ont été mesurées en condition normale (marquage avant la fixation des leucocytes) et lorsque le marquage est réalisé sur les cellules fixées au formaldéhyde (solution 1, kit Intraprep, Beckman Coulter) (*Figure 24*).

Pour l'ensemble des marqueurs, nous n'observons pas d'extinction ou de forte diminution de la fluorescence à l'exception de CD27 dont le site antigénique reste tout de même accessible (60% de fluorescence par rapport au contrôle). Pour les autres marqueurs, la reconnaissance des Ac pour leur Ag montrent que les sites antigéniques des protéines d'intérêt sont peu ou pas altérés par les fixateurs à base de formaldéhyde aux concentrations préconisées par le fournisseur. La fluorescence des marqueurs CD56 et CD200 est même plus élevée lorsque le marquage est réalisé sur des cellules fixées. Ces résultats montrent que le marquage des protéines de surface de notre panel peut être réalisé sur des cellules fixées au formaldéhyde.

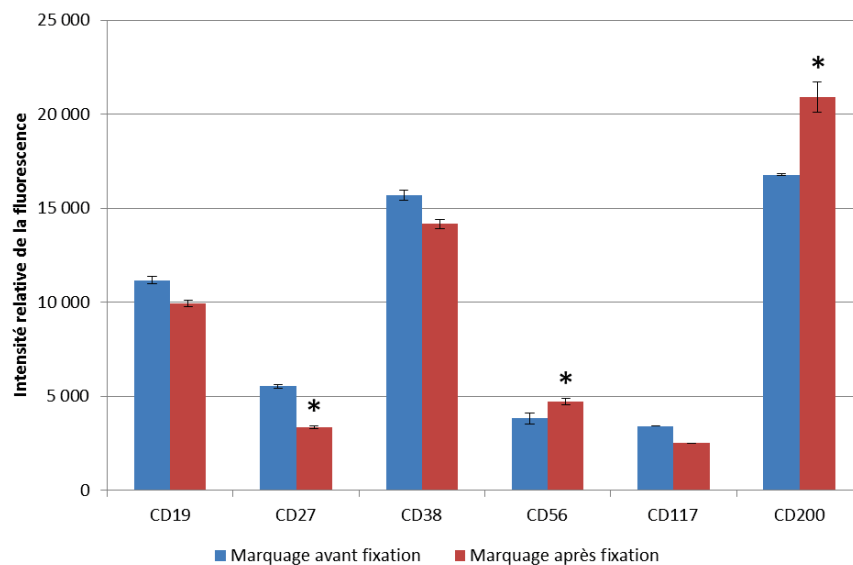


Figure 24 : Suivi de l'intensité de fluorescence des Ac dirigés vers CD19, CD27, CD38, CD56 et CD200 ($n=3$) et CD117 ($n=1$) sur des cellules non fixées et fixées.

* Indique que la fluorescence du marqueur est significativement différente par rapport au contrôle (p -value $< 0,05$) (Test de Student).

b. Perméabilisation

Les intensités de fluorescence des Ac dirigés vers les protéines de surface ont été comparées en condition normale (cellules non perméabilisées) et pendant la perméabilisation des cellules avec une solution à base de saponine (solution 2, Intraprep, Beckman Coulter) (Figure 25). Cette étude dite d'observation n'a été réalisée qu'en monoplicat avant d'être validée sur des échantillons de moelles.

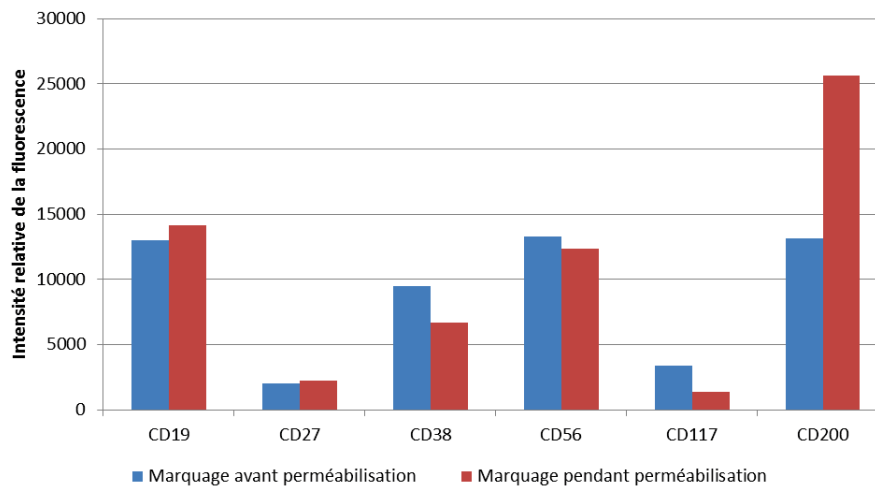


Figure 25 : Suivi de l'intensité de fluorescence des Ac dirigés vers CD19, CD27, CD38, CD56, CD117 et CD200 sur des cellules non perméabilisées et perméabilisées

Pour les marqueurs CD19, CD27, CD38 et CD56, il n'y a pas de différence observable entre les deux conditions, la perméabilisation n'affecterait pas ces protéines membranaires. Pour le marqueur CD117, plus de 50% de la fluorescence est perdue entre la condition normale et la condition où les cellules sont perméabilisées. Cependant, le signal du marqueur reste détectable et l'utilisation d'un fluorochrome plus brillant pourrait être envisagée. Concernant CD200, sa fluorescence est presque doublée quand les cellules sont perméabilisées. Il est possible que la concentration de cette protéine soit également très élevée dans le cytoplasme.

3. Conclusions

Les travaux réalisés dans le cadre de l'optimisation du protocole de préparation de moelle osseuse pourraient permettre de réduire considérablement le temps ainsi que le coût du test (Figure 26). En effet, la lyse à base de saponine est bien plus rapide que la lyse au NH_4Cl . De plus, la fixation des leucocytes est directement faite lors de la lyse érythrocytaire grâce au formaldéhyde présent dans le réactif. Les résultats précédents ont montré que le marquage de l'ensemble des protéines de surface de notre panel pouvait être réalisé sur des cellules fixées. De plus, nous avons montré que ces mêmes protéines étaient détectables une fois les cellules perméabilisées rendant possible le marquage de toutes les protéines, membranaires et intracytoplasmiques, pendant la perméabilisation des cellules. Le manque d'échantillons biologiques ne nous a pas permis de valider ces résultats préliminaires sur des échantillons de moelle osseuse mais il sera nécessaire de le faire afin de finaliser la phase d'optimisation. Le protocole initial est composé de 6 étapes et nécessite le recrutement d'un technicien pour une durée d'au moins 3h. Une fois optimisé, le protocole ne comprend plus que 3 étapes pouvant être réalisées en un peu plus d'une heure. La charge de travail

est ainsi divisée par deux et la diminution du nombre d'étapes rend l'usage du protocole plus simple. L'utilisation d'un cocktail d'Ac permet également de faciliter les marquages et d'éviter les erreurs de pipetage augmentant ainsi la reproductibilité du test. Enfin, de nouveaux Ac REA recombinants ont été développés (www.miltenyibiotec.com). Ils sont plus uniformes d'un lot à un autre comparé aux AcM de souris et de rat traditionnellement utilisés. Ces Ac REA sont modifiés par recombinaison pour produire des Ac hautement spécifiques. Une fois que l'ensemble des Ac de notre panel seront couverts par cette nouvelle technologie, l'étape de blocage des sites non spécifiques pourrait être supprimée.

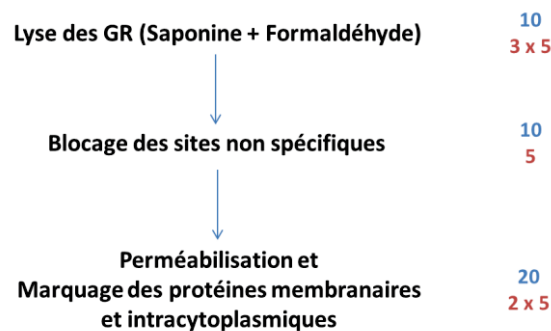


Figure 26 : Optimisation du protocole de préparation d'un échantillon de moelle osseuse comprenant les temps d'incubation (en bleu) et les temps de lavage en centrifugation (en rouge).

Le temps total nécessaire à ce protocole est de 1h10min.

Etude 2 : Développement d'un préparateur

L'optimisation du protocole de préparation d'un échantillon permet d'augmenter considérablement la rapidité du test. En parallèle, nous avons développé une maquette de préparation d'échantillons biologiques (sang ou moelle) dans le but d'automatiser toutes les étapes du protocole sans l'intervention d'un technicien. Le point critique de cette étude est le remplacement de la méthode de lavage et d'enrichissement des GB après la lyse des GR, effectuée jusqu'à maintenant par centrifugation. Cette dernière méthode prend du temps et la mise en place d'une centrifugeuse dans un petit préparateur serait complexe.

Dans la solution que nous avons développée, nous avons remplacé la technique de centrifugation par la technique de filtration. Cette dernière est développée pour retenir les populations leucocytaires dans deux situations différentes : (1) suite à la lyse érythrocytaire, où les débris de GR doivent passer au travers du filtre, (2) et lors des lavages, où seuls les liquides et de grosses molécules sont filtrés. Deux filtres seront alors utilisés, le premier aura une surface de filtration plus large avec une taille de pores plus importante pour laisser passer les débris cellulaires tout en retenant les cellules d'intérêt alors que le second filtre sera composé de pores qui permettront uniquement le passage de liquides et de grosses molécules.

1. Description de la maquette

HORIBA Medical développe et produit des analyseurs hématologiques tels que le Yumizen H500⁵. Cet automate compact permet, entre autres, de compter les cellules sanguines (GR, GB et PLT) et d'identifier les 5 sous-populations leucocytaires (lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles et basophiles). Le Yumizen H500 possède tous les composants nécessaires au développement d'un préparateur d'échantillons : une aiguille de prélèvement, trois seringues (air, PBS, lyse) et des électrovannes pour contrôler la circulation fluide, des moteurs pour activer les seringues et l'aiguille et des bacs (rinçage, incubation). Une maquette de Yumizen H500 a donc été utilisée comme base pour le développement de notre préparateur. Le banc optique initialement utilisé pour compter les cellules sanguines a été retiré et remplacé par d'autres composants tels que des filtres (filtre 1 et filtre 2), des capteurs de vidange et une pompe péristaltique (*Figure 27*). Les deux filtres permettent de retenir les leucocytes, le premier permet d'éliminer les GR et le second est utilisé lors des lavages. Les capteurs de vidange sont installés au-dessus des filtres pour contrôler l'arrêt de la filtration et ainsi éviter l'assèchement des cellules à la surface des filtres. La pompe péristaltique

⁵ <http://www.horiba.com/fr/medical/products/hematology/yumizen-h500/>

permet de transférer la solution du premier filtre au second filtre. Le circuit hydropneumatique de la maquette est schématisé en **Annexe 3**.

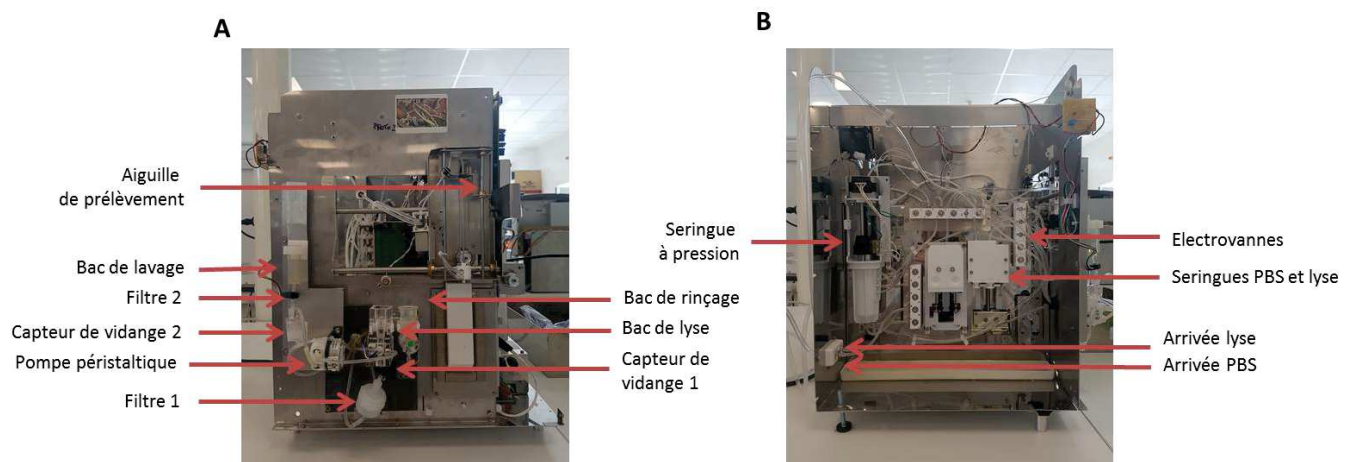


Figure 27 : Maquette du préparateur d'échantillons biologiques de face (A) et de côté (B).

2. Langage et cycles

L'ensemble des moteurs et des électrovannes sont commandés grâce à un langage de programmation qui a été développé en interne : le langage KED. Il permet d'actionner les différents moteurs contrôlant l'aiguille de prélèvement, les seringues et la pompe. Chaque mouvement de ces moteurs est défini par un nombre de pas et permet aux réactifs et aux composés sanguins ou médullaires de circuler dans l'ensemble du circuit fluidique de la maquette.

Un certain nombre de cycles ont été programmés, dont les principaux sont :

- Le cycle d'amorçage ou de vidange des réactifs (lyse et PBS)
- Le cycle de rinçage du circuit fluidique
- Le cycle dédié à la filtration après lyse érythrocytaire pour évaluer le filtre 1
- Le cycle dédié à la filtration lors des lavages pour évaluer le filtre 2
- Le cycle complet du prélèvement de l'échantillon à la récupération des leucocytes marqués

3. Intégration de la filtration dans la maquette

a. Présélection des filtres

Dans un premier temps, nous avons sélectionné deux filtres différents afin de les intégrer dans la maquette pour récupérer les leucocytes (1) après la lyse des GR et (2) lors des lavages des cellules. Nous avons recherché les différents filtres existants sur le marché. Onze filtres qui diffèrent par leur taille de pores, leur surface de filtration et leur composition (*Tableau IX*) ont été comparés

manuellement. L'ensemble de ces filtres possède une surface hydrophile pour laisser passer les solutions aqueuses ainsi qu'une charge neutre.

Tableau IX : Différents filtres sélectionnés pour la filtration après lyse érythrocytaire.

PET : Polyester ; PES : Polyéthersulfone ; PVDF : Difluorure de polyvinylidène.

| Fournisseur | Sartorius | Macherey Nagel | | | Millipore | |
|-------------------------------------|----------------------|----------------|-----|-----|-----------|-----------------------|
| Composition | Acétate de cellulose | Fibre de verre | PET | PES | PVDF | Polycarbonate |
| Diamètre (en mm) | 28 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Taille de pores (en μm) | 1,2 - 5 | 1 | 1,2 | 5 | 5 | 0,8 - 1,2 - 3 - 5 - 8 |

Le criblage manuel des filtres a été réalisé sur du sang frais lysé au NH_4Cl grâce à un système simple développé en interne. Il est composé de deux seringues raccordées de part et d'autre au filtre seringue (ou au support de membrane) (Figure 28). La première seringue permet de pousser la solution lysée au travers du filtre, alors que la seconde seringue est utilisée pour récupérer les cellules piégées dans le filtre avec une solution d'éluion.

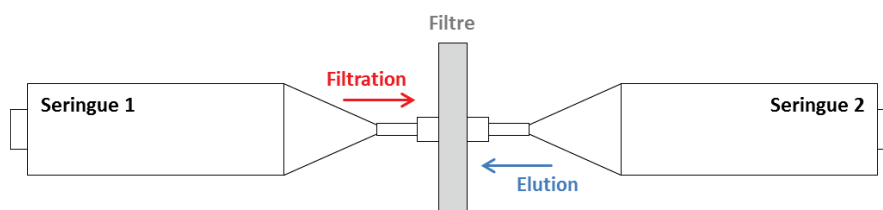


Figure 28 : Schéma du système de filtration manuelle.

Le système comprend une première (1) seringue pour filtrer la solution lysée (flèche rouge) et seconde (2) seringue pour récupérer les cellules avec une solution d'éluion (flèche bleue).

Parmi les onze filtres testés, seuls les filtres en acétate de cellulose de $5\mu\text{m}$ et en polycarbonate de 3- $5\text{-}8\mu\text{m}$ ne se sont pas bouchés. Malgré des tailles de pores et de particules filtrées équivalentes, la composition des filtres, la densité des pores ainsi que le maillage qui forme les pores peuvent favoriser la rétention des particules à la surface du filtre. A titre d'exemple, le filtre en difluorure de polyvinylidène (PVDF) et le filtre en polycarbonate possèdent des pores de taille équivalente ($5\mu\text{m}$). Néanmoins, le filtre en PVDF est composé d'un maillage plus serré que le filtre en polycarbonate (Capelle et al., 2008) ce qui favorisent le piégeage des particules dans le filtre et provoque à termes son bouchage. A l'inverse des autres filtres, tels que les filtres en acétate de cellulose, les pores des filtres en polycarbonate sont créés avec un laser (Figure 29).

Afin de limiter la perte en leucocytes, les filtres de polycarbonate de 5 μ m et 8 μ m n'ont pas été utilisés. Seuls les filtres en acétate de cellulose de 5 μ m et en polycarbonate de 3 μ m ont été retenus pour la suite du développement.

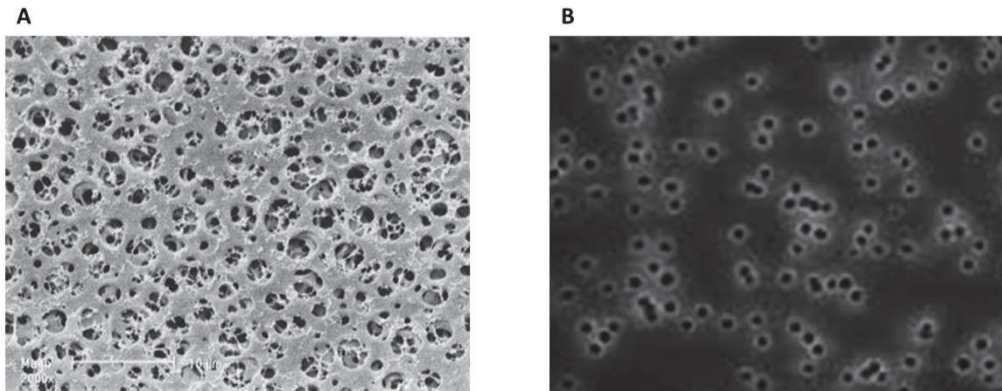


Figure 29 : Observation microscopique de la surface des filtres (A) en acétate de cellulose (www.sartorius-france.fr) et en (B) polycarbonate (www.merckmillipore.com).

Les pores irréguliers du premier filtre sont formés par le maillage du matériau alors que les pores réguliers du second filtre sont créés par un laser.

b. Automatisation de la filtration

Après avoir sélectionné les deux filtres les plus adaptés à la récupération des leucocytes suite à la lyse érythrocytaire, les filtres en acétate de cellulose (5 μ m) et en polycarbonate (3 μ m) ont été comparés à l'aide d'un processus automatique. Pour cela, un cycle spécifique a été programmé. Il permet de prélever du sang ou de la moelle dans un tube. Le prélèvement est ensuite poussé avec un volume de lyse dans un bac. Un bullage est réalisé pendant l'incubation afin d'homogénéiser la solution et d'accélérer le processus de lyse pendant l'incubation. Après une incubation de 15min, la solution passe au travers du premier filtre et une fois la solution filtrée, un volume de PBS est renvoyé sous le filtre (élution ou « back-flush ») pour récupérer les cellules retenues au-dessus (Figure 30). Lors de la filtration, le capteur de vidange vérifie que la totalité de la solution ne soit pas filtrée. En effet, il est nécessaire de conserver le filtre et les cellules dans un volume minimum de solution afin d'éviter que ces dernières s'assèchent à la surface du filtre. Lorsque le cycle est terminé, la solution enrichie en GB est récupérée et comparée au sang entier de départ grâce à une analyse NFS réalisée par un automate d'HORIBA Medical (Yumizen H500 ou ABX Pentra80).

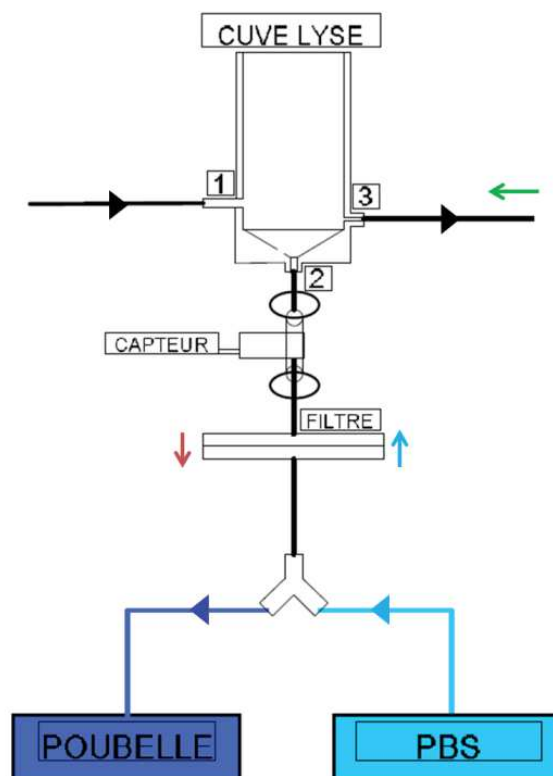


Figure 30 : Schéma simplifié du système de filtration automatique.

Le sang entier ajouté à la lyse entre dans la cuve de lyse par l'orifice (1). Lors de l'incubation, de l'air (flèche verte) est envoyée par l'orifice (3) pour homogénéiser la solution et accélérer la lyse (bullage). Après l'incubation, la solution lysée est filtrée par dépression (2) du haut du filtre vers le bas du filtre (flèche rouge) et le filtrat est éliminé vers les déchets. La filtration est arrêtée lorsque le capteur de vidange ne détecte plus la solution (= air). La solution d'éluion (PBS) est envoyée du bas du filtre vers le haut du filtre (flèche bleue) pour récupérer les leucocytes dans la cuve de lyse par l'orifice (2). La solution enrichie en leucocytes est transférée dans la cuve de marquage par l'orifice (3).

Ce cycle a été réalisé sur 10 échantillons de sang frais avec les deux types de filtres (*Figure 31*). Sur l'ensemble des échantillons, le filtre en polycarbonate permet de récupérer plus de leucocytes (31,3% en moyenne) que le filtre en acétate de cellulose (17,7% en moyenne). La taille des pores, de 3 μ m pour le polycarbonate et de 5 μ m pour l'acétate de cellulose, peut expliquer ce résultat. De plus, il est possible que les GB restent piégés dans les mailles du filtre en acétate de cellulose et ainsi perturber leur récupération lors de l'élution. La surface lisse du polycarbonate serait plus adaptée à la récupération des GB que la surface poreuse de l'acétate de cellulose. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser le filtrat.

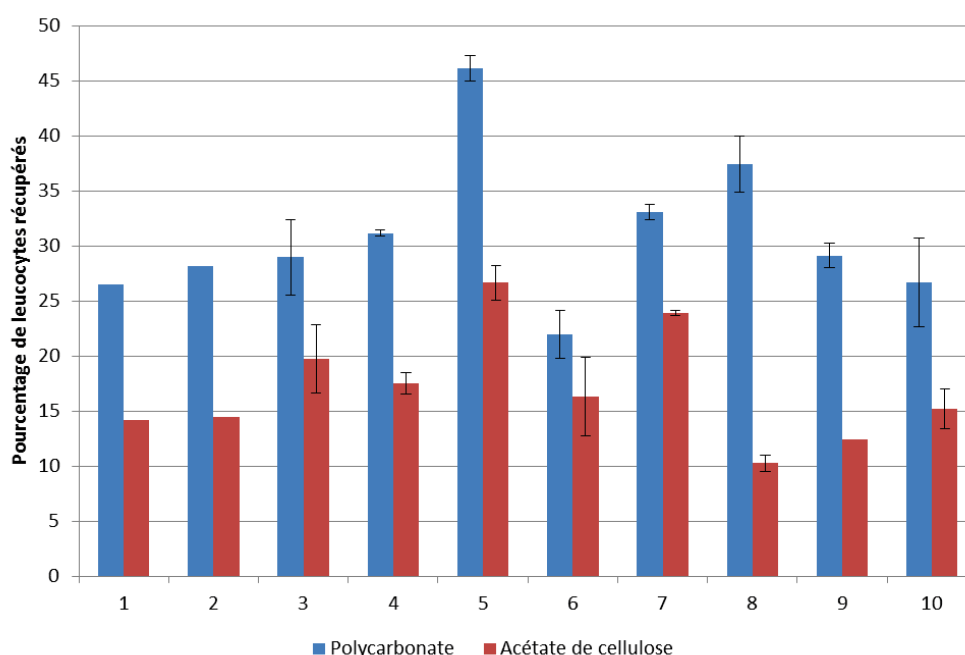


Figure 31 : Pourcentage de leucocytes récupérés avec les filtres en polycarbonate et en acétate de cellulose (n=10) par rapport à la concentration en leucocytes de l'échantillon de sang initial.

Nous nous sommes ensuite demandé si ces filtres privilégiaient la récupération d'une population leucocytaire au dépend d'une autre. Les automates d'HORIBA Medical permettent d'identifier et de comptabiliser les 5 populations de leucocytes. Les analyses des 10 échantillons précédents montrent qu'il n'y a pas de variation significative entre le sang non filtré et filtré avec les deux types de filtres à l'exception des monocytes (*Figure 32*). Avec les deux filtres, une légère perte des monocytes est observée qui est accentuée avec le filtre en acétate de cellulose. La proportion des autres populations leucocytaires est conservée, notamment celle des lymphocytes (ou plasmocytes) qui représentent les plus petits leucocytes.

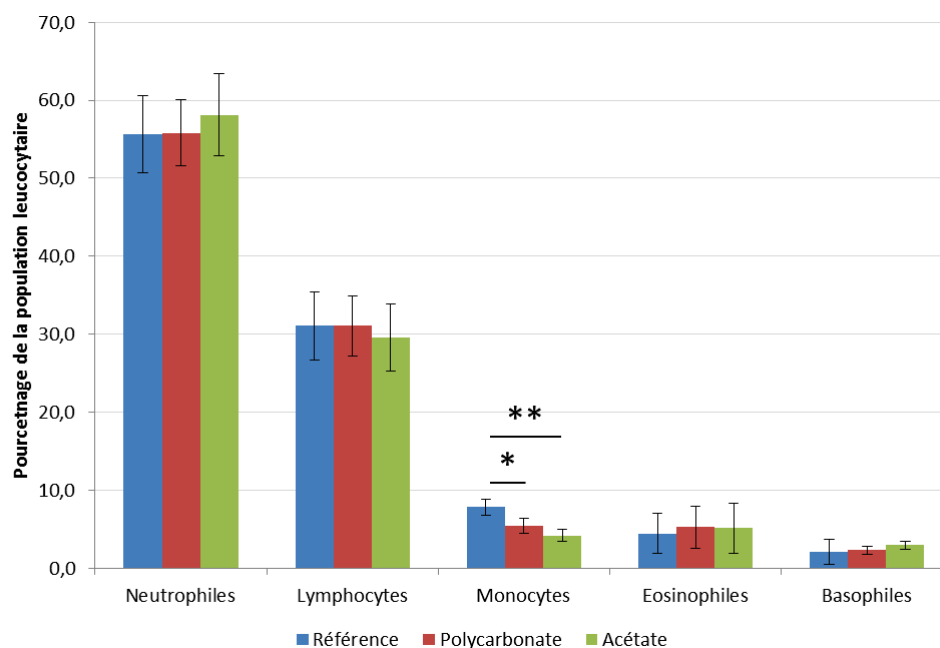


Figure 32 : Proportion des sous-populations leucocytaires.

Elle est calculée lors de l'analyse sur le Yumizen H500 pour l'échantillon de sang non filtré (bleu) et filtré avec les filtres en polycarbonate (rouge) et en acétate de cellulose (vert) (n=10).

* et ** indiquent que la proportion de la population est significativement différente par rapport au contrôle avec une p-value <0,05 et <0,001 respectivement (Test de Student).

Une fois le filtre en polycarbonate de 3µm sélectionné, nous avons vérifié que les différents réactifs mis en contact lors de la filtration ne dégradait pas le matériau composant le filtre. En effet, la dégradation du filtre entrainerait une perte significative des GB. Des filtres en polycarbonate ont été immergés pendant 24h dans du PBS et de la lyse NH₄Cl. Après 24h, la structure des filtres reste intacte. Une lyse des GR peut être réalisée directement au contact de ce type de filtre sans altérer le matériau et la filtration.

Nous avons mesuré la concentration des autres éléments figurés sanguins (PLT et GR) récupérés après la lyse érythrocytaire et la filtration des débris. Nous avons évalué le nombre de lavages nécessaires pour éliminer le maximum de GR et de débris (Figure 33). A la première élution, une moyenne de 25% des GB sont récupérés alors que plus de 80% des GR sont éliminés lors de la filtration (n=9). Néanmoins, un grand nombre d'évènements sont comptés dans le canal des PLT (112% de PLT). Ces évènements correspondent à des débris cellulaires. La succession de lavages permet d'éliminer ces débris et les GR, le nombre de GB diminuant légèrement aussi. Le dernier lavage permet de récupérer une moyenne près de 20% de GB, d'éliminer plus de 98% des GR et plus de 80% des débris et PLT.

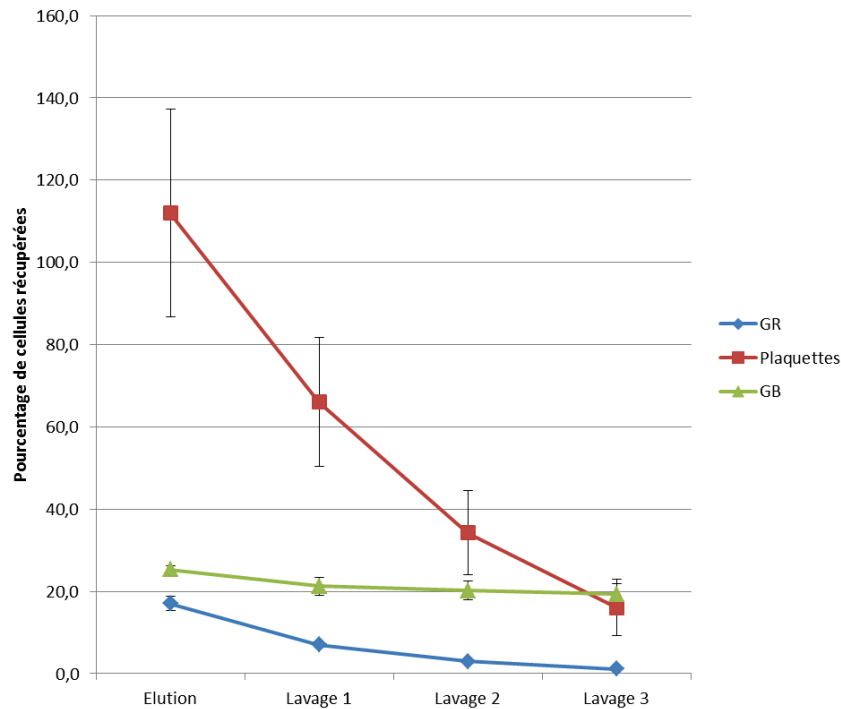


Figure 33 : Pourcentage de leucocytes, d'érythrocytes et de PLT (ou débris cellulaires) par rapport à l'échantillon de départ suite à des lavages successifs après la lyse érythrocytaire et la filtration (n=9).

Pour finir, nous avons comparé le nombre de cellules récupérées avec notre technique de filtration et avec la technique de référence, la centrifugation, à partir d'échantillons de sang après lyse érythrocytaire. Des marquages des cellules récupérées ont été réalisés pour identifier différentes populations cellulaires, les leucocytes (CD45+) et les débris de GR, et deux sous-populations lymphocytaires, les lymphocytes T (CD3+) et les lymphocytes B (CD19+) (Figure 34A). Les résultats de CFM montrent que la récupération des GB grâce à la filtration n'apporte pas de biais sur le comptage des populations leucocytaires, notamment des sous-populations lymphocytaires B et T. Grâce à l'ajout de billes de comptage (Flow-Count fluorospheres, Beckman Coulter), nous avons observé que la centrifugation permettait de récupérer environ deux fois plus de GB que la filtration. Cependant, la filtration permet d'éliminer plus de débris que la technique de centrifugation (Figure 34A) grâce à son système rapide et automatique d'éluion et de lavages. Avec les deux techniques, plus de 98% des leucocytes restent vivants après lyse érythrocytaire (Figure 34B). De plus, le test de viabilité montre que la technique de filtration elle-même n'altère pas la viabilité des leucocytes.

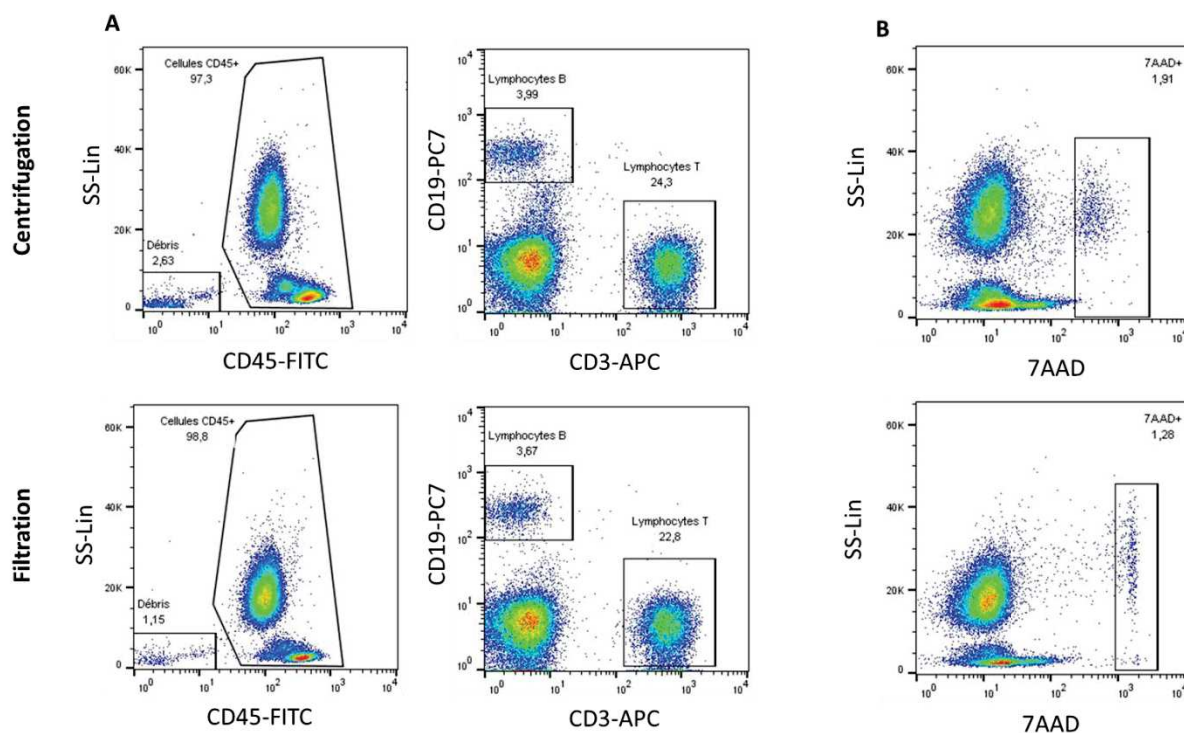


Figure 34 : Marquage en CFM des cellules récupérées après centrifugation et filtration à partir de sang lysé.

(A) Dénombrement des leucocytes CD45+ et des sous-populations lymphocytaires B (CD19+) et T (CD3+). (B) Test de viabilité des cellules centrifugées et filtrées grâce à un détecteur d'apoptose, le 7AAD.

4. Conclusions et perspectives

Le développement de la maquette d'un préparateur d'échantillons biologiques et l'intégration de la méthode de filtration montrent des résultats prometteurs. L'ensemble des précédents tests de filtration ont été réalisés sur des sangs lysés avec une lyse à base de NH_4Cl . Des tests de filtration ont également été effectués sur des sangs lysés avec une lyse à base de saponine et de formaldéhyde. Les résultats de ces tests sont de bonnes qualités comparés aux résultats obtenus avec la lyse NH_4Cl . En effet, la lyse à base de saponine a entraîné un bouchage systématique du filtre. Nous avons vu que cette lyse génère une grande quantité de débris suite à la lyse par solubilisation de la membrane érythrocytaire (Schreier et al., 2000) alors que la lyse au NH_4Cl provoque l'éclatement des GR par choc osmotique (Chernyshev et al., 2008). Une fois la membrane des GR percée suite au choc osmotique, ces derniers libèrent l'hémoglobine intracellulaire et prennent la forme d'un « ghost ». Dans leur état normal, les GR sont capables de passer dans des capillaires de $3\mu\text{m}$ (Sosa et al., 2014) grâce à leurs propriétés de déformabilité (Kim et al., 2015). Les « ghosts » de GR pourraient conserver ces mêmes propriétés et passer plus facilement au travers des pores du filtre. À l'inverse,

la lyse à base de saponine crée une grande quantité de particules de la taille des PLT à partir des GR et provoque la formation de micelles qui peuvent être observées sous la forme de filaments. Ces deux phénomènes pourraient boucher les pores en formant un tapis sur la surface du filtre. Nos tests ont montré que la filtration ne permettait de récupérer qu'une moyenne de 31% des GB, ce pourcentage étant bien inférieur à celui que l'on peut observer après une centrifugation. Une analyse de moelle osseuse de patients atteints de MM en CFM nécessite environ 400 μ L de matériel de départ. Pour pallier ce problème, un volume plus important de sang ou de moelle pourrait être prélevé par l'automate. A ce jour l'automate, prélève un volume de 1mL de sang pour l'analyse. De plus, la récupération des GB après la lyse érythrocytaire est réalisée automatiquement en moins de 2 min avec notre système de filtration alors que le temps nécessaire pour une centrifugation de ce type est de 5 min, auxquels doit s'ajouter le temps de manipulation du technicien.

Des résultats préliminaires ont montré que le filtre en polycarbonate de 1,2 μ m serait un bon candidat pour effectuer les lavages lors des marquages. Cette filtration ne devrait pas entraîner de perte de GB car seuls des liquides doivent passer au travers des pores du filtre pour effectuer les lavages.

Une fois le second filtre validé, il faudra automatiser la distribution du fixateur, la fixation ne pouvant être réalisée pendant la lyse, du perméabilisant et du cocktail d'Ac des protéines de surface et intracellulaires. L'ensemble de ces dépôts seront réalisés par l'aiguille de prélèvement qui peut prélever un volume minimum de 50 μ L avec une précision de $\pm 2\mu$ L.

Nous avons développé une preuve de concept (sur échantillon sanguin) pour entièrement automatiser la préparation d'un échantillon biologique sanguin ou médullaire avant son analyse en CFM. Une maquette de ce préparateur a montré de premiers résultats prometteurs. Lorsque l'ensemble des étapes seront intégrées dans cette maquette, il faudra réaliser une évaluation pour valider l'ensemble du processus par rapport la méthode manuelle de référence. L'automatisation permet de diminuer considérablement le temps nécessaire à la préparation, initialement réalisée par un technicien, et augmente ainsi la productivité et la reproductibilité du test. La charge de travail du technicien est alors diminuée, et ce dernier n'a plus qu'à transférer l'échantillon préparé au niveau du cytomètre.

Discussion et Perspectives

« Nous ne sommes savants que de la science présente »

Montaigne

Le suivi de la MRD est un puissant facteur pronostique dans le MM. En effet, les études précédentes ont démontrées que la présence de cellules tumorales résiduelles 100 jours après une autogreffe de CSH est associée à une survie sans rechute et une survie globale significativement plus faibles. Cette valeur pronostique se retrouve chez les patients à haut risque ou à risque standard sur le plan cytogénétique (Paiva et al., 2008, 2012a, Rawstron et al., 2013, 2015). En conséquence, la MRD représente un marqueur de choix pour déterminer l'efficacité de nouveaux traitements (Landgren et al., 2014; Mailankody et al., 2015), spécifiquement dans le MM compte tenu de l'augmentation de la complexité des schémas thérapeutiques et de l'augmentation du pourcentage de réponse complète obtenu et de la survie globale. Les essais thérapeutiques de première ligne nécessitent des suivis de 5 à 10 ans pour démontrer des différences significatives sur la survie des patients. De plus, la MRD a démontré sa valeur pronostique dans différents essais cliniques indépendamment du traitement reçu.

Le nombre de plasmocytes proliférant au moment du diagnostic est dans la plupart des cas très élevé (>10% des cellules mononucléées de la moelle osseuse), ce qui rend la détection des cellules tumorales facilement réalisable en CFM. A l'inverse, la détection des cellules qui survivent à la première ligne de traitement et qui provoquent la rechute des patients est complexe. En effet, les plasmocytes représentent une population rare dans la moelle osseuse (<5% des cellules mononucléées) et la proportion des plasmocytes tumoraux persistants est encore plus faible. La MRD est dite positive quand on détecte 1 cellule tumorale parmi 100 000 cellules totales (Arroz et al., 2016; Landgren and Rajkumar, 2016). Il est donc nécessaire d'utiliser une technique très sensible pour détecter quelques cellules tumorales parmi une large population leucocytaire. La CFM est la technique de référence pour confirmer le diagnostic du MM et pour réaliser le suivi de la MRD. Pour une analyse entre 2 et 10 millions de cellules totales, la sensibilité de la technique atteint 0.001%, soit une profondeur de 10^5 (Arroz et al., 2016). Bien que les techniques de biologie moléculaire comme la PCRq ou le séquençage soient aussi sensibles en nécessitant moins de matériel biologique (Mailankody et al., 2015; Sarasquete et al., 2005), elles restent cependant plus longues et plus complexes à mettre en œuvre que la CFM. Dans le but de simplifier le processus d'analyse d'échantillons en cytométrie, de la préparation de l'échantillon jusqu'au traitement des résultats issus de l'analyse, nous avons développé une solution complète intégrant toutes les étapes. Ainsi, la simplification du panel de cytométrie, l'automatisation de la préparation et l'analyse automatique des résultats ont pu être développées. En parallèle, nous avons identifié de nouveaux marqueurs membranaires différentiellement exprimés par les plasmocytes tumoraux par rapport aux plasmocytes normaux et nous avons développé un score pronostique basé sur l'expression de ces

marqueurs afin de compléter les outils que nous avons conçus pour améliorer la prise en charge des patients atteints de MM.

Choix du « panel MM »

Nous avons développé un panel de cytométrie dédié à l'identification des plasmocytes normaux et tumoraux. Afin de détecter la population plasmocytaire totale, nous avons sélectionné 3 marqueurs : CD38, kappa et lambda. En effet, lors d'un stage au sein d'HORIBA Medical, une étudiante avait montré que l'utilisation de ces trois marqueurs était la meilleure combinaison pour discriminer les plasmocytes totaux par rapport aux autres leucocytes. L'utilisation des marqueurs CD45, CD38, CD138, kappa et lambda avaient été comparés, notamment grâce à une analyse en composante principale. CD38 est un marqueur caractéristique de la lignée plasmocytaire, il est fortement exprimé par ces cellules (Lin et al., 2004; Rawstron et al., 2008) mais peut être également exprimé par les cellules B au cours de la différenciation (Romero-Ramírez et al., 2015). L'expression intracytoplasmique des chaînes légères kappa et lambda est très forte dans les plasmocytes (Paiva et al., 2010; Rawstron et al., 2008) dont la fonction principale est de produire et de sécréter des Ig. Ces cellules ne sont capables de produire qu'un seul type de chaîne légère tout au long de leur vie, kappa ou lambda. Le ratio normal de plasmocytes sécrétant ces chaînes légères est de 2/3 kappa pour 1/3 lambda (Rajkumar et al., 2005b). Lorsqu'un clone plasmocytaire prolifère, cette balance va être déséquilibrée en faveur des plasmocytes kappa ou lambda. En plus de servir à l'identification des plasmocytes, les deux marqueurs de chaînes légères de notre panel vont également permettre de calculer le ratio lambda/kappa. Ce ratio autorise la détection de la population clonale quand cette dernière représente plus de 30% de la population polyclonale (Rawstron et al., 2008). Bien que les marqueurs CD38, kappa et lambda ne soient pas spécifiques des cellules plasmocytaires, leur combinaison ainsi que leur niveau d'expression permettent d'identifier très clairement ces cellules d'intérêt parmi les autres leucocytes. Dans la littérature, d'autres marqueurs spécifiques des plasmocytes ont été décrits dont le plus connu est le CD138. Ce marqueur est très largement utilisé dans les panels de cytométrie pour détecter les plasmocytes mais présente néanmoins un inconvénient majeure. En effet, une perte progressive de l'expression de CD138 a été observée peu de temps après le prélèvement de moelle osseuse (Christensen et al., 2012; Jourdan et al., 1998; Lin et al., 2004; Reid et al., 2010). Ceci conduit à la perte totale de l'expression du marqueur après 8h (Dorwal et al., 2014), et rend ainsi impossible l'identification des plasmocytes. Plus récemment, de nouveaux marqueurs fortement exprimés dans les cellules plasmocytaires ont été décrits : CD229, CD269 et CD319 (Frigyesi et al., 2014; Muccio et al., 2016; Pojero et al., 2016). Ces marqueurs pourraient remplacer le CD138 ou le CD38 de notre panel. De plus, l'usage dans des essais cliniques de nouveaux traitements combinant les drogues conventionnelles (e.g. Melphalan, Bortezomib,

Lenalidomide, Dexaméthasone) avec des AcM comme le Rituximab (anti-CD20), l'Elotuzumab (anti-CS1) ou le Daratumumab (anti-CD38) (Donato et al., 2014; van de Donk et al., 2012; Zagouri et al., 2016) entraîne parfois la perte d'expression des Ag ciblés. Une étude a montré que les cellules tumorales de patients atteints de MM réfractaire traités au Daratumumab pouvaient perdre l'expression de CD38 (Ise et al., 2016). Cette situation interfère dans le suivi de la MRD de ce groupe de patients lorsque la stratégie de sélection des plasmocytes est basée sur l'expression de CD38. C'est pourquoi il est important de développer de nouvelles stratégies d'identification des cellules d'intérêt comprenant soit de nouveaux marqueurs, comme précédemment décrits, soit des Ac multi-épitopes ou intracytoplasmiques capables de reconnaître les cellules de patients traités avec cet AcM. Dans la majorité des stratégies de CFM, la sélection des plasmocytes est réalisée sur la matrice CD38/CD45. L'expression de CD45 est très hétérogène au sein des plasmocytes, que ce soit au sein des cellules normales (Bataille et al., 2006; Robillard et al., 2005) ou entre les plasmocytes normaux et tumoraux (Gupta et al., 2009). Les marqueurs kappa et lambda étant plus spécifiques des plasmocytes, la sélection de cette population est plus facile et plus nette sur les dimensions CD38/kappa et CD38/lambda que sur la matrice CD38/CD45. Il existe néanmoins une limitation à l'utilisation des chaînes légères pour la sélection des plasmocytes. Certains cas de MM présentent un clone plasmocytaire ne sécrétant pas d'Ig. Dans le cas des MM non sécrétant (3% des cas de MM) (Lonial and Kaufman, 2013), la détection des plasmocytes tumoraux n'est pas réalisable avec les marqueurs kappa et lambda. Un ou plusieurs autres marqueurs de plasmocytes doivent alors être sélectionnés lors du diagnostic pour réaliser le suivi de la MRD.

Une fois la population plasmocytaire totale sélectionnée, les plasmocytes tumoraux doivent être discriminés par rapport aux plasmocytes normaux. Les plasmocytes tumoraux présentent des profils d'expression aberrants qui permettent de les identifier. Néanmoins, il n'existe pas de profil d'expression unique et spécifique des cellules tumorales. Leur identification est réalisée grâce à une combinaison de marqueurs connus pour être exprimé de façon différente dans les cellules tumorales comparées aux cellules normales. Les marqueurs les plus répandus sont CD19, CD27, CD45 et CD81, sous-exprimés dans les cellules tumorales comparées aux cellules normales, et CD20, CD28, CD33, CD52, CD56, CD117 et CD200, surexprimés dans les plasmocytes tumoraux comparés aux plasmocytes normaux. Dans son dernier rapport, l'« International Myeloma Working Group » recommande d'utiliser les marqueurs CD56, CD19 à minima et CD20, CD27, CD28, CD81, CD117 et CD200 pour augmenter la sensibilité de la détection des cellules tumorales (Kumar et al., 2016). Le marqueur CD19 est sous-exprimé dans plus de 95% des cellules tumorales (Gupta et al., 2009; Jeong et al., 2012; Lin et al., 2004; Tembhare et al., 2014) mais cette perte d'expression n'est pas spécifique de ces cellules. Certains plasmocytes normaux peuvent également perdre l'expression de CD19 sans

pour autant avoir un caractère tumoral (Tembhare et al., 2014). La sensibilité et la spécificité d'un panel dépendent du nombre de marqueurs utilisés. Cependant, chaque ajout de marqueurs entraîne de nombreux inconvénients, par exemple en complexifiant la compensation et l'analyse multidimensionnelle. De plus, l'augmentation du nombre de marqueurs entraîne une élévation du nombre de détecteurs et de sources lumineuses nécessaires à la collecte des signaux de fluorescence. Les lasers sont les sources lumineuses les plus communément implémentées dans un cytomètre et font partis des composants les plus chers de ce dernier. Ainsi, l'augmentation du nombre de lasers impacte fortement le prix du cytomètre. De plus, l'utilisation de plusieurs lasers peut entraîner des problèmes d'alignement réduisant la stabilité optomécanique du système. Pour associer la sensibilité et la spécificité du panel avec la restriction du nombre de sources lumineuses nécessaires, nous avons utilisé des pools de marqueurs de cellules tumorales. Les marqueurs qui présentent un changement de niveau d'expression équivalent dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales (perte ou gain d'expression) sont couplés au même fluorochrome. Les marqueurs CD19 et CD27, couplés au PE-Cy7 sont peu ou pas exprimés par les cellules plasmocytaires tumorales, tandis que les marqueurs CD56, CD117 et CD200, couplés au PE, sont exprimés de façon aberrante par les plasmocytes tumoraux. La technique des pools de marqueurs a déjà été utilisée dans d'autres panels dédiés à l'analyse d'échantillons de patients atteints de MM (Robillard et al., 2013b).

Le suivi du niveau d'expression des 8 marqueurs (CD38, kappa, lambda, CD19/27 et CD56/CD117/CD200) couplés à 5 fluorochromes (PE-Cy5.5, PE-CF594, FITC, PE-Cy7 et PE) est réalisé dans un tube unique. Communément, un tube comprenant les Ac isotypes est utilisé en tant que contrôle négatif pour déterminer le niveau de marquage non spécifique aux récepteurs Fc. Toutes les Ig peuvent se fixer de manière non spécifique à des cellules exprimant des récepteurs Fc à leur surface. Les Ac produits chez la souris ont la particularité de se lier fortement aux leucocytes d'origine humaine. Dans notre panel, la sélection des plasmocytes sur les dimensions CD38/kappa et CD38/lambda permet de discriminer les plasmocytes sécrétant les chaînes légères kappa des plasmocytes sécrétant les chaînes légères lambda. La population plasmocytaire clonale ne sécrétant qu'un seul type de chaîne légère (kappa ou lambda), l'autre population plasmocytaire est utilisée comme contrôle interne pour évaluer le niveau d'expression des marqueurs de la population tumorale. En cytométrie, les contrôles internes remplacent de plus en plus les tubes d'Ac isotypes (Arroz et al., 2016) permettant ainsi de diminuer le volume d'Ac et de réactifs nécessaires.

Nos résultats ont montré que notre panel présentait une sensibilité et une spécificité équivalentes au panel utilisé en routine au laboratoire STI du CHU de Montpellier. Cette forte corrélation entre les deux panels est rendue possible grâce à l'utilisation des mêmes marqueurs de cellules tumorales.

Malgré le nombre important de marqueurs, notre panel ne requiert qu'une seule source lumineuse (e.g. laser bleu 488nm) grâce aux pools d'Ac. La combinaison de l'ensemble de ces marqueurs dans un unique tube permet de faciliter la préparation des échantillons, de diminuer les volumes de réactifs (solution de lyse, de lavage, de perméabilisation et de fixation) et de faciliter l'analyse des résultats générés. En effet, l'acquisition de plusieurs tubes en cytométrie génère le même nombre de fichiers FCS. Il n'est pas possible d'étudier le niveau d'expression de l'ensemble des paramètres des différents fichiers pour un même évènement. Le panel utilisé en routine dans le laboratoire STI est composé de plusieurs tubes (Caraux et al., 2012). Chaque tube est composé d'un tronc commun d'Ac pour détecter la population plasmocytaire et d'un marqueur de cellules tumorales dans chacun des tubes. L'analyse de l'expression de ces marqueurs ne peut pas être réalisée simultanément sur les mêmes évènements à moins d'utiliser des logiciels tels qu'Infinicyt™ qui fusionne les fichiers d'analyse. Cependant, l'ouverture simultanée de plusieurs fichiers de taille importante impacte considérablement les performances de ce logiciel⁶. L'utilisation d'un unique tube génère un seul fichier FCS. Dans notre cas, l'expression de l'ensemble des protéines de surface spécifiques des plasmocytes tumoraux pourra être suivie sur exactement les mêmes évènements de la population plasmocytaire. Le panel EuroFlow, référence dans l'analyse d'échantillons de patients atteints de MM en CFM, est composé de deux tubes (van Dongen et al., 2012). Ils comprennent un tronc commun de d'Ac pour sélectionner les plasmocytes (CD38, CD45 et CD138) et discriminer la majorité des plasmocytes tumoraux par rapport aux cellules normales (CD19 et CD45). Huit marqueurs additionnels sont utilisés pour caractériser les plasmocytes (CD27, CD28, CD56, CD81, CD117, kappa, lambda, et beta-2 microglobuline). Parmi ces 12 marqueurs, 7 sont retrouvés dans notre panel. Comme nous l'avons vu précédemment, les marqueurs CD138 et CD45 ont été remplacés par les chaînes légères à cause de la labilité de CD138 et de l'hétérogénéité de l'expression de CD45. Le marqueur de la beta-2 microglobuline est utilisé uniquement comme facteur pronostique dans le panel EuroFlow. Le marqueur CD200 de notre panel a aussi une valeur pronostique (Moreaux et al., 2006) mais il permet également de discriminer les plasmocytes normaux et tumoraux. Enfin, il serait intéressant de savoir si l'utilisation des marqueurs CD28 et CD81 apporterait réellement une valeur ajoutée par rapport aux marqueurs de notre panel. Ces deux marqueurs sont exprimés de façon aberrante par les plasmocytes dans 10 à 45% des cas de MM pour CD28 (Rawstron et al., 2008) et dans 55% des cas de MM pour CD81 (Flores-Montero et al., 2016a; Tembhare et al., 2014) alors que le marqueur CD200 est différentiellement exprimé par les plasmocytes tumoraux dans plus de 70% des cas de MM (Flores-Montero et al., 2016a).

⁶ <http://www.infinicyt.com/support/infinicyt-readme-file>

De plus, il serait d'un grand intérêt de combiner le suivi de la MRD avec le cycle cellulaire. Le taux de prolifération des cellules myélomateuses est un bon indicateur du stade de la maladie et peut être mesuré grâce au pourcentage de plasmocytes en phase S du cycle cellulaire (Greipp and Kumar, 2005). Normalement, le pourcentage de cellules en phase S est inférieur à 1% (Kumar et al., 2009). Au diagnostic, il a été montré que les patients qui présentaient des plasmocytes avec une forte activité proliférative (>3% des cellules en phase S) étaient associés à un mauvais pronostic (García-Sanz et al., 2004; San Miguel et al., 1995). Lors du suivi, le taux de prolifération des cellules tumorales persistantes pourrait indiquer si la progression de la maladie résiduelle est plus ou moins active et pourrait ainsi permettre d'adapter la prise en charge du patient. Pour ce faire, il faudrait combiner notre panel à un kit de suivi de la prolifération cellulaire (e.g. kit EdU⁷). Le suivi de la prolifération des cellules tumorales persistantes nécessitent néanmoins d'acquérir un grand nombre d'évènements pour observer une variation du pourcentage de cellules en phase S.

Automatisation de la préparation

Une fois le panel dédié à l'analyse d'échantillons de patients atteints de MM défini, nous avons décidé de développer une maquette pour automatiser la préparation des échantillons sans l'intervention d'un technicien.

Rappelons que le protocole initial de préparation des échantillons comprend principalement une étape de lyse érythrocytaire, suivie du marquage des protéines de surface, de la fixation des cellules, de leur perméabilisation et du marquage des protéines intracytoplasmiques ; toutes ces étapes comprenant de multiples lavages. Dans un premier temps, nous avons travaillé à simplifier le protocole de préparation des échantillons afin de limiter le nombre d'étapes et de faciliter leur automatisation. L'évaluation de l'intensité de fluorescence des marqueurs de surface utilisés dans notre panel a montré que le marquage de ces derniers pouvait être réalisé avant ou après la fixation et pendant la perméabilisation des cellules. Nous avons montré que les réactifs utilisés dans notre protocole, comprenant du formaldéhyde (fixation) et de la saponine (perméabilisation), n'altèrent pas les sites antigéniques de nos protéines d'intérêt aux concentrations recommandées par le fabricant. Le marquage des protéines de surface et intracytoplasmiques peut être réalisé simultanément et diminue ainsi considérablement le temps nécessaire à la préparation de l'échantillon. Dans certains protocoles d'immunophénotypage, le marquage des protéines de surface est réalisé sur des cellules fixées (Mascher et al., 1999; Perez et al., 2004) notamment dans le cas où des cocktails d'Ac combinant marqueurs de surface et intracytoplasmiques sont utilisés (Oldaker et al., 2016). Les avantages de ce type de cocktails, retrouvés sous la forme liquide ou lyophilisée, sont

⁷ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10419>

le gain de temps et la facilité d'utilisation, qui permet de diminuer le taux d'erreurs de manipulation dépendant du nombre de marqueurs qui composent le panel.

Pour développer notre préparateur nous avons utilisé une base de Yumizen H500, un automate d'hématologie d'entrée de gamme 5Diff développé et produit par HORIBA Medical. L'ensemble des composants de cette maquette ont été conservés à l'exception du banc optique. Dans la majorité des protocoles d'immunomarquage, les lavages sont réalisés par centrifugation. Dans notre maquette, nous avons intégré un système de filtration automatique pour remplacer la méthode standard d'enrichissement leucocytaire. La méthode de filtration est ici plus rapide que la méthode de centrifugation et ne nécessite que très peu de place dans un automate à l'inverse d'un système de centrifugation. Certains chercheurs se sont inspirés des filtres utilisés lors de chirurgies cardio-pulmonaires (déleucocytation du sang total) pour récupérer les leucocytes piégés (Longley and Stewart, 1989; Meyer et al., 2005). Ces systèmes de filtration manuelle fonctionnent par gravité et sont ainsi très lents. Afin d'accélérer la technique, certains groupes ont développé des systèmes de filtration par pression (Coumans et al., 2013a; Yu et al., 2011). Notre système automatique est composé de deux filtres en polycarbonate de 3 μ m et 5 μ m et de deux capteurs de vidange placés au-dessus de chaque filtre. La filtration du sang lysé est effectuée par dépression grâce à la seringue d'air de la maquette qui va venir aspirer la solution lysée sous le filtre. Les capteurs de vidange permettent de contrôler la filtration et d'éviter l'assèchement des cellules à la surface du filtre. Comme Comans et al., il serait intéressant d'ajouter à notre système des capteurs pour contrôler le débit ainsi que la pression pour prévenir de tout dommage au niveau des filtres (Coumans et al., 2013a, 2013b). Dans leurs travaux, Yu et al. ont analysé les cellules récupérées après la filtration de sangs totaux ou après la centrifugation de sangs lysés. Comme dans notre étude, la technique de centrifugation leur a permis de récupérer plus de leucocytes que la technique de filtration. Cependant, le groupe de chercheurs a retrouvé un grand nombre de débris parmi les cellules récupérées après centrifugation comparé à la technique de filtration (Yu et al., 2011), donnant ainsi un avantage à cette dernière technique. En effet, l'absence de débris dans un échantillon analysé en CFM permet d'acquérir un plus grand nombre de leucocytes avant d'atteindre la saturation du système. Dans notre système, une fois la solution lysée entièrement filtrée, une solution d'élution est injectée sous le filtre pour récupérer les leucocytes. Des lavages successifs sont effectués pour éliminer les débris érythrocytaires et les PLT afin de récupérer une solution riche en leucocytes. Ce système de filtration automatique permet à l'heure actuelle de récupérer en moyenne 30% des leucocytes après la lyse érythrocytaire et d'éliminer 98% des GR. La filtration effectuée n'a pas d'impact sur la proportion des sous-populations leucocytaires. A notre connaissance, il n'existe pas encore de système de filtration automatique dédié à l'enrichissement des leucocytes. Le seul

système qui se rapprocherait de celui que nous avons développé est composé d'une pompe automatique raccordée à un filtre et un réservoir de PBS pour effectuer les dilutions et l'élution (Coumans et al., 2013b).

Cette maquette permet à l'heure actuelle de prélever un échantillon de sang ou de la moelle osseuse dans un tube, d'incuber ce prélèvement avec de la lyse, de filtrer la solution lysée pour récupérer les leucocytes et éliminer les PLT et les débris de GR, de transférer la solution dans un bac de marquage et de concentrer la solution en leucocytes. Une fois la solution enrichie en leucocytes, faute de temps, la fixation, la perméabilisation et le marquage des Ac sont réalisés manuellement dans le bac de marquage alors que les lavages sont automatisés. A terme, toutes ces étapes pourront être automatisées, notamment grâce à la distribution des réactifs avec l'aiguille de prélèvement suffisamment précise pour les faibles volumes.

L'automatisation de la préparation d'échantillons biologiques dédiés à l'analyse en CFM est un grand challenge car peu de solutions existent à ce jour. Notre maquette nécessite encore quelques réglages pour la distribution des réactifs et les lavages. Une fois les réglages réalisés et les résultats de notre préparateur validés, ce dernier pourra permettre de diminuer considérablement la charge de travail des techniciens. Il permettra également de diminuer le temps nécessaire à la préparation de l'échantillon grâce à l'intégration de la technique de filtration qui remplace la centrifugation, technique plus lente. Enfin, l'automatisation du processus augmentera la reproductibilité et la productivité et réduira les erreurs dues à la manipulation manuelle.

Automatisation de l'analyse des résultats

Une fois que la préparation automatique et l'analyse en CFM d'un échantillon biologique sont réalisées, il est nécessaire de traiter les résultats générés. L'analyse des résultats est réalisée manuellement dans la majorité des cas grâce à des logiciels dédiés tels que FlowJo, Infinicyt ou encore Kaluza et Diva, des logiciels fournis par les fabricants de cytomètres. L'augmentation du nombre de paramètres mesurés par le cytomètre complexifie l'analyse multidimensionnelle (Lugli et al., 2010). Le nombre restreint de paramètres utilisés dans notre stratégie de fenêtrage permet de faciliter considérablement l'analyse manuelle. Les multiplets et les débris sont éliminés sur les dimensions FSC et SSC qui sont conventionnellement utilisées (Gonsalves et al., 2014; Rawstron et al., 2013). La sélection de la population plasmocytaire est facilitée sur les dimensions CD38/kappa et CD38/lambda comparée à leur sélection sur la matrice CD38/CD45 (Gonsalves et al., 2014; Rawstron et al., 2008; Salama et al., 2015). L'évaluation des profils immunophénotypiques des plasmocytes pour les 5 marqueurs caractéristiques des cellules tumorales est réalisée uniquement sur deux dimensions grâce à l'usage des pools d'Ac.

Malgré une stratégie de fenêtrage facilitée, la subjectivité de l'analyste ne peut pas être évitée lors d'une analyse manuelle (Bashashati and Brinkman, 2009). Des variations inter-analystes et intra-analyste (analyse réalisée à des temps différents) ont déjà été observées (Lugli et al., 2010). Pour éviter ces erreurs, des logiciels d'analyses automatiques ont été développés. Ces logiciels sont basés sur des méthodes supervisées ou non-supervisées. Chacun de ces logiciels présentent des avantages et des limitations et il n'existe pas à ce jour de logiciel ou de méthode adaptés à tous les jeux de données et toutes les analyses de CFM. Les méthodes supervisées nécessitent un jeu de données d'apprentissage pour pouvoir définir les différents groupes auxquels seront associés les évènements du nouveau jeu de données. La sélection des plasmocytes avec notre panel est réalisée sur les dimensions CD38/kappa et CD38/lambda. Le nombre de plasmocytes et le niveau d'expression des chaînes légères kappa et lambda sont très variables d'un individu à un autre. De ce fait, il est complexe et parfois impossible d'associer des évènements « plasmocytes » d'un échantillon donné à une population « plasmocytes » définie par le jeu de données d'apprentissage. Dans le cas de nos échantillons, nous sélectionnons des plasmocytes qui représentent normalement moins de 5% des cellules dans la moelle. Lors du suivi de la maladie résiduelle, la proportion de plasmocytes au sein de la moelle est bien plus faible, on parle alors de population rare. Pour détecter au plus tôt la rechute, il est nécessaire d'identifier 1 cellule tumorale parmi 10^5 cellules totales ($0.001\%/10^5$) (Arroz et al., 2016). Les logiciels non-supervisés, basés sur l'identification de clusters, sont moins performants sur la détection de population rare (Finak et al., 2009; Lo et al., 2008). En effet, les évènements d'une population rare sont souvent associés à des clusters voisins de plus grande taille au lieu d'être attribués à un cluster unique. De plus, pour détecter la MRD, un nombre minimum de 30 cellules tumorales doit être compté pour obtenir un résultat significatif (Arroz et al., 2016). Pour dénombrer 30 cellules tumorales tout en conservant la même sensibilité et la même profondeur, il est nécessaire d'acquérir au minimum 2×10^6 cellules totales, voire entre 5- et 10×10^6 cellules totales pour une acquisition optimale (Mailankody et al., 2015; Stetler-Stevenson et al., 2016). Le nombre de données à analyser augmente avec le nombre de cellules acquises ainsi que le nombre de paramètres, qui dépend de la complexité du panel. Le second inconvénient de certaines de ces méthodes non-supervisées est alors le temps nécessaire à l'analyse du jeu de données. Il dépend du nombre de données à analyser, et peut devenir très élevé (de quelques minutes à quelques heures) (Aghaeepour et al., 2013). Les méthodes supervisées et non supervisées présentent un certain nombre d'inconvénients, c'est pourquoi nous avons développé notre logiciel d'analyse de résultats issus de la CFM dans le cadre de l'identification des plasmocytes avec notre « panel MM ». Ce logiciel est inspiré des méthodes supervisées, le nombre de classes ainsi que les dimensions sur lesquelles sont recherchées les populations sont connus avant l'analyse automatique. La méthode de sélection des différentes populations est quant à elle inspirée des méthodes non-supervisées. Notre modèle, basé

sur la distribution (normale) et la densité des données, permet de gérer correctement la variabilité inter-individus. La définition des populations pré-analytique permet à notre logiciel de traiter un échantillon très rapidement (moins d'une minute) alors que le modèle utilisé permet d'identifier finement les différentes populations. Ce logiciel est spécifique de l'identification des plasmocytes normaux et tumoraux avec notre panel. Cependant, il est possible de modifier les paramètres du logiciel pour identifier des cellules impliquées dans d'autres pathologies grâce à l'utilisation de panels spécifiques.

Identification de nouveaux marqueurs membranaires

Afin de découvrir de nouveaux marqueurs caractéristiques des plasmocytes dans le cadre du MM, nous avons traité des données de puces de cellules primaires de patients atteints de MM. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'expression des gènes codants des protéines de surface déjà décrites dans les cellules immunitaires humaines. Ces protéines sont très largement utilisées pour discriminer les différentes populations leucocytaires en CFM (Flores-Montero et al., 2016b; Muccio et al., 2016; Pojero et al., 2016) et sont parfois la cible d'AcM utilisés dans de nouveaux traitements (Donato et al., 2014; van de Donk et al., 2012; Sondergeld et al., 2015), au stade d'essais cliniques. Parmi l'ensemble des gènes codants pour des protéines de surface, 16 gènes sont sous-exprimés et 9 gènes sont surexprimés dans les cellules primaires de patients comparées aux cellules de donneurs sains. Parmi les gènes sous-exprimés, CD11a, CD19, CD27, CD52, CD79a, CD81 et CD82 ont déjà été décrits dans le MM. CD19, CD27 et CD81 sont utilisés pour discriminer les plasmocytes tumoraux des plasmocytes normaux (Rawstron et al., 2008). Les fonctions de CD5L, CD16, CD24, CD36, CD68, CD80, CD84, CD99 et CD163 n'ont pas encore été décrites dans le MM. Parmi ces nouveaux marqueurs, CD5L, CD16, CD24, CD36, CD68, CD80, CD84, CD163 sont également sous-exprimés dans les cellules de lignées plasmocytaires comparées aux cellules primaires de patients. La perte d'expression de ces marqueurs serait associée à l'évolution de la maladie. Il serait intéressant d'étudier l'expression protéique de ces marqueurs afin de les utiliser pour la sélection des plasmocytes tumoraux en CFM. Ces nouveaux marqueurs pourraient compléter ou remplacer certains marqueurs de notre « panel MM ». Parmi les gènes surexprimés, CD1D, CD32, CD47, CD59 et CD200 ont déjà été décrits dans le MM. Les fonctions de CD2BP2, CD109, CD300a et CD320 n'ont pas encore été étudiées. Les gènes CD2BP2 et CD320 sont également surexprimés dans les cellules de lignées plasmocytaires comparées aux cellules primaires de patients et les protéines codées par ces gènes pourraient être la cible d'AcM thérapeutique comme le Samalizumab qui cible CD200 (van de Donk et al., 2012; Mahadevah et al., 2010).

Parallèlement, nous avons corrélé ces données d'expression génique à des données de survie de patients atteints de MM de deux cohortes indépendantes pour identifier les gènes qui avaient une valeur pronostique. Nous avons détecté 4 gènes associés à une valeur pronostique, CD24, CD27, CD36 et CD302. L'expression de ces 4 gènes est associée à un bon pronostic. L'information de l'expression de ces gènes a été combinée pour construire un score de risque séparant les patients de bon et de mauvais pronostics. Ce score a été validé dans 4 cohortes indépendantes de patients atteints de MM. Notre score prédit la survie globale et la survie sans rechute au moment du diagnostic. Parmi les 4 cohortes utilisées, une cohorte est composée de patients traités par du Bortézomib en monothérapie (Mulligan et al., 2007). Le suivi d'expression des gènes CD24, CD27, CD36 et CD302 pour les patients de cette cohorte a été réalisé au moment de la rechute. Notre score prédit ainsi également la survie globale au moment de la rechute. De plus, les patients du groupe de mauvais pronostic selon notre score seraient associés à une mauvaise réponse au traitement au Bortézomib. Notre score basé sur l'expression de 4 gènes codants pour des protéines de surface est très simple et rapide à mettre en œuvre. Il possède l'avantage d'impliquer un nombre restreint de gènes comparé aux autres scores connus et basés sur l'expression de gènes (Botta et al., 2016; Chen et al., 2012; Decaux et al., 2008; Hose et al., 2011b; Kassambara et al., 2014; Shaughnessy et al., 2007). Ces gènes associés à une valeur de bon pronostic rendent difficile le suivi leur expression sur des lignées cellulaires myélomateuses. Les puces affymetrix ont révélé une expression génique très faible pour CD24, CD27, CD36 et CD302. Une corrélation entre l'expression génique et l'expression protéique de ces marqueurs sur des lignées semblait compliquée à établir. Pour transposer notre score à la cytométrie, il faudrait corréler l'expression génique et protéique de CD24, CD27, CD36 et CD302 sur des cellules primaires de patients atteints de MM. Pour établir une telle corrélation, les résultats de puces et les résultats issus de l'analyse en CFM seraient comparés pour chaque patient au diagnostic. Pour l'analyse en CFM, un « panel MM » contenant les Ac CD24, CD27, CD36 et CD302 serait utilisé. L'application de ce score en cytométrie rendrait son utilisation bien plus simple, plus rapide et moins coûteuse.

Perspectives

Lors de cette thèse nous avons principalement développé des outils dédiés à l'automatisation et à la simplification des phases en amont et en aval d'une analyse d'échantillon en CFM. Les travaux de cette thèse ont été réalisés dans le cadre d'un projet d'Innovation Stratégique Industrielle (ISI – BPI France) nommé DAT@DIAG. Un autre sous-projet DAT@DIAG avait pour but de développer un analyseur d'hématologie intégrant un laser supercontinuum comme source lumineuse associé à des filtres pour exciter spécifiquement les fluorochromes choisis. Ce laser présente l'avantage de couvrir le spectre de plusieurs lasers grâce à son spectre s'étalant de 350 nm à 1750 nm. Outre son large

spectre, l'avantage majeur du laser supercontinuum est son coût. Il est plus faible qu'un module à deux lasers. A l'heure actuelle, le système développé avec ce laser blanc peut mesurer quatre paramètres simultanément, l'impédance (correspond au FSC en cytométrie), le SSC et 2 fluorescences ou l'impédance et 3 fluorescences (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 650 et Alexa Fluor 750). Lors de l'acquisition des données issues de l'analyse de l'échantillon biologique, un fichier .fcs est généré comme en cytométrie. De plus, il est intéressant de noter que ce système est doté d'un capteur de variation d'impédance qui déclenche la mesure dans la fenêtre optique (laser supercontinuum). La mesure d'impédance permet de quantifier les cellules analysées ce qui est rarement effectué lors d'une analyse en cytométrie. Mes travaux ont permis de développer toutes les briques nécessaires à l'automatisation d'un test compagnon pour le diagnostic du MM et pour le suivi de la MRD du MM. Bien que notre « panel MM » ne nécessite qu'un seul laser (e.g. bleu 488nm), il serait intéressant de tester certains marqueurs de notre panel sur ce système. Si les résultats venaient à être concluants, HORIBA Médical pourrait alors proposer une solution complète de CFM pour la prise en charge de patients atteints de MM. Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'identification des cellules tumorales dans des échantillons de patients atteints de MM. Cette pathologie a servi de modèle et notre approche ainsi que les outils que nous avons développé pourraient être transposés à n'importe quelle autre hémopathie.

Conclusion générale

Les travaux réalisés au cours de ces trois années de thèse m'ont permis de développer des outils dédiés à l'identification et à la caractérisation des plasmocytes normaux et tumoraux dans le cadre du MM. Le suivi de la MRD du MM est complexe car il demande une grande sensibilité et spécificité pour détecter les cellules tumorales persistantes au plus tôt. Plus l'identification de ces cellules est précoce, plus la prise en charge du patient pour la seconde ligne de traitement sera rapide.

Au cours de cette thèse, nous avons développé une solution complète dédiée à l'identification de cellules plasmocytaires anormales dans un échantillon de sang ou de moelle osseuse. Cette solution, basée sur la CFM, a pour but d'entièrement automatiser les phases pré- et post-analytiques du test. Au niveau de la phase pré-analytique, le préparateur d'échantillons biologiques analysés en CFM que nous développons permettra de réduire les erreurs liées à la manipulation manuelle et ainsi d'augmenter la reproductibilité et la productivité des tests. Le logiciel de détection des cellules plasmocytaires tumorales à partir d'analyses de CFM permet quant à lui d'automatiser la phase post-analytique. L'ensemble de ces travaux s'inscrivent parfaitement dans un contexte de standardisation des techniques d'analyses, qui est devenue primordiale en clinique. Cette solution permet de diminuer significativement le coût ainsi que le temps nécessaire à la préparation et l'analyse du test, d'augmenter la productivité et la reproductibilité du test tout en conservant la même sensibilité et la même spécificité par rapport à des méthodes de référence. Enfin, l'automatisation et la simplicité de notre solution pourraient permettre de délocaliser le suivi de la MRD dans des laboratoires non-spécialisés afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de MM.

Parallèlement, le score basé sur l'expression des gènes *CD24*, *CD27*, *CD36* et *CD302* que nous avons construit permet de prédire la survie des patients, d'adapter le traitement à chaque patient en fonction du résultat et ainsi de s'orienter vers la médecine personnalisée.



Annexes



 **Annexe 1. Method for the prognosis of multiple myeloma**

Jérôme Moreaux et **Elina Alaterre**

Demande prioritaire de brevet (EP n° 16305651), déposée le 03/06/2016

 **Annexe 2. Détection de la maladie résiduelle du myélome multiple**

Jérôme Moreaux, Bernard Klein, Guilhem Requirand, Sébastien Raimbault, **Elina Alaterre** et Jean-Michel Garcia

Demande prioritaire de brevet (FR n° 1654514), déposée le 20/05/2016

 **Annexe 3. Schéma du circuit hydropneumatique de la maquette de préparateur**

Annexe 1

Brevet 1. Method for the prognosis of multiple myeloma

Jérôme Moreaux et **Elina Alaterre**

Demande prioritaire de brevet (EP n° 16305651), déposée le 03/06/2016

Résumé de l'invention

L'invention a pour objet l'utilisation d'une valeur correspondant au niveau d'expression de quatre marqueurs parmi CD24, CD27, CD36 et CD302 dans un échantillon d'un individu atteint de MM pour prédire la survie dudit individu.

Cette invention concerne également une méthode *in vitro* pour prédire la survie d'un individu atteint de MM comprenant les étapes suivantes :

- a) Mesure du niveau d'expression de chacun des quatre marqueurs sélectionnés parmi CD24, CD27, CD36 et CD302 dans un échantillon dudit patient,
- b) Comparaison de la valeur de l'expression mesurée en a) avec la valeur de référence de chaque marqueur testé, et
- c) Prédiction de la survie dudit patient atteint de MM grâce à la comparaison effectuée en b).

Selon le mode de réalisation de la méthode de prédiction *in vitro*, le niveau d'expression d'un marqueur sélectionné parmi CD24, CD27, CD36 et CD302 correspond au niveau d'expression génique dudit marqueur.

Selon le mode de réalisation de la méthode de prédiction *in vitro*, le niveau d'expression d'un marqueur sélectionné parmi CD24, CD27, CD36 et CD302 correspond au niveau d'expression protéique dudit marqueur.

Cette invention est également relative à une méthode d'évaluation de l'efficacité d'un composé utilisé dans le cadre du traitement d'un individu atteint de MM.

CONFORME AU DEPOT**TITLE OF THE INVENTION**

Method for the prognosis of multiple myeloma.

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to field of prognosis of multiple myeloma by measuring biological markers.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Multiple myeloma is one of the most common forms of hematological malignancy. It occurs in increasing frequently with advancing age, with a median age at diagnosis of about 65 years.

 Multiple myeloma is the second most common hematological malignancy, although the exact causes of multiple myeloma remain unknown.

15 It is associated with an uncontrolled clonal proliferation of B-lymphocyte-derived plasma cells within the bone marrow. These myeloma cells replace the normal bone marrow cells, resulting in an abnormal production of cytokines, and in a variety of pathological effects, including for instance anemia, hypercalcemia, immunodeficiency, lytic bone lesions, and renal failure. The presence of a monoclonal immunoglobulin is frequently observed in the serum and/or urine of multiple myeloma patients.

20 Current treatments for multiple myeloma patients include chemotherapy, preferably associated when possible with autologous stem cell transplantation (ASCT).

 Treatment of MM in 2015 (eligible for stem cell transplantation) consists of an induction phase with four monthly courses of high doses of corticosteroid (Dexamethasone) and a proteasome inhibitor, sometimes in association with a cell cycle targeting drug or an immunomodulatory drug, a short term exposure to high dose of melphalan (usually 200 mg per square meter), an alkylating agent followed with autologous stem cell transplantation to rescue hematopoiesis and a maintenance treatment with dexamethasone and an immunomodulatory drug. Approximately one-third of patients with myeloma at diagnosis are older than 75 years and at least 30% are frail, because of the presence of concomitant disease, abnormal laboratory test results and symptoms or signs of disability that may complicate the presentation and management of myeloma. Today,
30 bortezomib–melphalan–prednisone (VMP) and melphalan–prednisone–thalidomide (MPT)

CONFORME AU DEPOT

are the reference treatments for elderly myeloma patients. Nevertheless, the efficacy of these regimens was less evident in patients aged 75 years or over. These findings raise the question of whether a lower dose intensity treatment with two-drug combinations may improve tolerability, preserving efficacy, in very elderly and frail patients, and thus should
5 be preferred to three-drug combinations.

Survival of patients with multiple myeloma is highly heterogeneous from periods of few weeks to more than ten years. This variability derives from heterogeneity in both tumor and host factors.

10 Several factors correlated with survival duration in multiple myeloma have been identified, including in particular serum levels of hemoglobin, calcium, creatinine, B2- microglobulin ($s\beta 2M$), albumin, C-reactive protein (CRP), platelets count, proliferative activity of bone marrow plasma cells, and deletion of chromosome arm 13q. Subsequently, various combinations of prognostic factors have been suggested for staging
15 classification of myeloma patients. A staging system for multiple myeloma has been developed through an international collaboration between several teams (GREIPP et al., J Clin Oncol, 23, 3412-20, 2005). A combination of serum $\beta 2M$ and serum albumin was retained as providing the simplest, most powerful and reproducible three-stage classification. This International Staging System (ISS) consists of the following stages:
20 stage I, serum $\beta 2M$ less than 3.5 mg/L plus serum albumin >3.5 g/dL (median survival, 62 months); stage II, neither stage I nor III (median survival, 44 months); and stage III, $S\beta 2M >5.5$ mg/L (median survival, 29 months).

It is thus important to identify factors associated with prognosis, in order to better predict disease outcome, and optimize patient treatment.

25 To diagnose and follow up minimal residual disease in MM, the expression of some markers have already been evaluated in the art by multiparametric flow cytometry (MFC) at protein level. CD19, CD20, CD27, CD28, CD56 and CD117 have been described in the art to discriminate BMPC from MMC (Rawstron et al., 2008, Haematologica, Vol. 91 : 1577-1578). The expression of these CD markers is not
30 homogeneous on all MMC, on one hand all markers do not present aberrant expression and on the other hand expression level of each CD marker changes according to the sample (Gupta et al., 2009, Am. J Clin Pathol, Vol. 132 : 728-732; Raja et al., 2010, Br J

CONFORME AU DEPOT

Haematol, Vol. 149 : 344-351; Seegmiller et al., 2007, Am J Clin Pathol, Vol. 127 : 176-181; Tembhare et al., 2014, Leuk Res, Vol. 38(3) : 371-376).

Indeed, MM is still an incurable disease even if some patients achieve a complete remission (CR). The treatment of relapsed/refractory patients is a challenge and the use of monoclonal therapeutic targets associated with others agents such as immunomodulatory drugs or proteasome inhibitor could be a new way to treat these patients. For example, anti-CD20 monoclonal antibodies (mAb) (rituximab, ofatumumab and obinutuzumab) were evaluated on patients and have improved event-free survival (EFS) and CR in chronic lymphocytic leukemia, another B-cell malignancy (Shah, 2015, Ther Clin Risk Manag.; Vol. 11 : 1113-1122). In MM, anti-CD40, CD38, CD138, CD56, B2-microglobulin, FGFR3 and CS-1 have demonstrated anti-tumor activity in preclinical models and in Phase I/II clinical trials (Donato et al., 2014, Expert Opin Bio Ther , Vol. 14(8): 1-18; van de Donk et al., 2012, Leukemia, Vol. 26 : 199-213). Moreover, the expression of some CD markers is known to be associated with prognosis value such as CD200 (Moreaux et al., 2006, Blood, Vol. 108 : 4194-4197).

Correlation between patient survival and novel markers would allow new prognosis factor identification and a better characterization of the disease including its classification in different stage of evolution. A better knowledge of the MM stage would permit to the clinicians to support patients with personalized treatment.

The invention has for purpose to meet the aforementioned needs.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to the use of an expression level value of each of the four markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 in a sample obtained from an individual affected with a multiple myeloma for predicting an outcome of a multiple myeloma in the said individual.

This invention also concerns an *in vitro* method for predicting outcome of multiple myeloma in an individual comprising the steps of :

a) measuring the expression level of each the four markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 in a sample obtained from the said individual,

CONFORME AU DEPOT

b) comparing the expression value measured at step a) with a reference value for each of the markers tested, and

c) determining the predicted outcome of multiple myeloma in the said individual from the comparison performed at step b).

5 In some embodiments of the *in vitro* prediction method, step c) comprises calculating a prognostic score value.

In some embodiments of the *in vitro* prediction method, the expression level of a marker selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 consists of the level of gene expression of the said marker.

10 In some embodiments of the *in vitro* prediction method, the expression level of a marker selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 consists of the level of protein expression of the said marker.

This invention also pertains to a method for determining the efficiency of a compound for treating a multiple myeloma in an individual comprising the steps of ;

15 a) performing the *in vitro* method according to any one of claims 2 to 8 on a sample obtained from the said individual before treatment with the said compound, so as to determine a first prediction of outcome of a multiple myeloma in the said individual,

b) performing the *in vitro* method according to any one of claims 2 to 8 on a sample obtained from the said individual after treatment with the said compound, so as to
20 determine a second prediction of outcome of a multiple myeloma in the said individual,

c) determining if the second prediction means a better outcome than the first prediction.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

25 **Figure 1 : Prognostic value of CD Gene Risk Score (CDGRS) in multiple myeloma.**

Using the Maxstat R function and Benjamini Hochberg multiple testing correction, 4 genes (CD24, CD27, CD36 and CD302) out of the 266 CD probesets were associated with a prognostic value in HM cohort (206 newly diagnosed patients). These 4 prognostic CD genes were used to create a CD gene risk score (CDGRS) resulting in two
30 groups with different OS. Group 1 comprised 72.8% of patients with a high expression of all or 2 or 3 out of the 4 CD genes (upper curve) and group 2 comprised 27.2% of patients with a high expression of 1 out of 4 CD genes or a low expression of all CD genes (lower

CONFORME AU DEPOT

curve). Group 2 (lower curve) is associated with a significant shorter OS compared to group 1 (upper curve). Abscissa : days from diagnosis. Ordinate : Overall Survival (OS).

Figure 2 : Prognostic value of CD Gene Risk Score (CDGRS) in multiple myeloma.

CDGRS was calculated in patients of UAMS-TT2 cohort (345 newly diagnosed patients) splitting patients in two groups. Group 1 comprised 72.8% of patients with a high expression of all or 2 or 3 out of the 4 CD genes (upper curve) and group 2 comprised 27.2% of patients with a high expression of 1 out of 4 CD genes or a low expression of all CD genes (lower curve). Group 2 (lower curve) is associated with a significant shorter OS compared to group 1 (upper curve). Abscissa : days from diagnosis. Ordinate : Overall Survival (OS).

Figure 3 : Prognostic value of CD Gene Risk Score (CDGRS) in multiple myeloma.

CDGRS was calculated in patients of Hovon cohort (282 newly diagnosed patients) splitting patients in two groups. Group 1 comprised 72.8% of patients with a high expression of all or 2 or 3 out of the 4 CD genes (upper curve) and group 2 comprised 27.2% of patients with a high expression of 1 out of 4 CD genes or a low expression of all CD genes (lower curve). Group 2 (lower curve) is associated with a significant shorter OS compared to group 1 (upper curve). Abscissa : days from diagnosis. Ordinate : Overall Survival (OS).

Figure 4 : Prognostic value of CD Gene Risk Score (CDGRS) in multiple myeloma.

CDGRS was calculated in patients of Mulligan cohort (188 patients at relapse) splitting patients in two groups. Group 1 comprised 72.8% of patients with a high expression of all or 2 or 3 out of the 4 CD genes (upper curve) and group 2 comprised 27.2% of patients with a high expression of 1 out of 4 CD genes or a low expression of all CD genes (lower curve). Group 2 (lower curve) is associated with a significant shorter OS

CONFORME AU DEPOT

compared to group 1 (upper curve). Abscissa : days from diagnosis. Ordinate : Overall Survival (OS).

Figure 5 : Prognostic value of CD Gene Risk Score (CDGRS) in multiple myeloma.

CDGRS was calculated in patients of HM cohort (206 newly diagnosed patients) splitting patients in two groups. Group 1 comprised 72.8% of patients with a high expression of all or 2 or 3 out of the 4 CD genes (upper curve) and group 2 comprised 27.2% of patients with a high expression of 1 out of 4 CD genes or a low expression of all CD genes (lower curve). Group 2 (lower curve) is also associated with a significant shorter EFS compared to group 1 (upper curve). Abscissa : days from diagnosis. Ordinate : Event Free Survival (EFS).

Figure 6 : Prognostic value of CD Gene Risk Score (CDGRS) in multiple myeloma.

CDGRS was calculated in patients of UAMS-TT2 cohort (345 newly diagnosed patients) splitting patients in two groups. Group 1 comprised 72.8% of patients with a high expression of all or 2 or 3 out of the 4 CD genes (upper curve) and group 2 comprised 27.2% of patients with a high expression of 1 out of 4 CD genes or a low expression of all CD genes (lower curve). Group 2 (lower curve) is associated with a significant shorter EFS compared to group 1 (upper curve); Abscissa : days from diagnosis. Ordinate : Event Free Survival (EFS).

Figure 7 : Prognostic value of CD Gene Risk Score (CDGRS) in multiple myeloma.

CDGRS was calculated in patients of Hovon cohort (282 newly diagnosed patients) splitting patients in two groups. Group 1 comprised 72.8% of patients with a high expression of all or 2 or 3 out of the 4 CD genes (upper curve) and group 2 comprised 27.2% of patients with a high expression of 1 out of 4 CD genes or a low expression of all CD genes (lower curve). Group 2 (lower curve) is associated with a significant shorter EFS compared to group 1 (upper curve). Abscissa : days from diagnosis. Ordinate : Event Free Survival (EFS).

CONFORME AU DEPOT**DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

The present invention provides for a novel prognosis marker of outcome of multiple myeloma in an individual.

5 The inventors have shown that a specific combination of biological markers is indicative of outcome in an individual with multiple myeloma.

More precisely, it is shown herein that the level of expression of a combination of markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 is indicative of outcome of multiple myeloma in an individual.

10 The inventors have shown that the level of expression of a combination of markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 allows predicting both (i) the overall survival time period (OS) of a patient affected with multiple myeloma and (ii) the time period free of a relapse event (EFS, also termed “Event Free Survival”) of a patient affected with multiple myeloma.

15 The inventors have also shown that the level of expression of a combination of markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 is indicative of the response of the said individual to a therapeutic treatment, e.g. a therapeutic treatment with the proteasome inhibitor such as bortezomib, mephalan, or a combination therapy such as a combination of dexamethasone and an immunomodulatory drug, a combination
20 of bortezomib, mephalan and prednisone, a combination of mephalan, prednisone and thalidomide. .

The level of expression of the combination of the markers CD24, CD27, CD36 and CD302 may be termed “CD-MM” marker herein.

25 As disclosed in the examples herein, the level of expression of each of the markers CD24, CD27, CD36 and CD302 may be used to define a score value that is indicative of the prognosis of multiple myeloma in a tested individual. As it is also shown herein, a relevant score value based on the expression level of each of the markers CD24, CD27, CD36 and CD302 may be determined according to various methods, which encompass calculating a CD Gene Risk Score (CDGR Score or CDGRS) with the Maxstat
30 R function method (e.g. Maxstat software, release 0.7-23, Torsten Hotborn).

The inventors have further confirmed the relevancy of a prognosis score value based on a combination of the expression levels of each of the markers CD24, CD27,

CONFORME AU DEPOT

CD36 and CD302 by showing, through a gene set enrichment analysis, that patients having a low risk CDGR Score value exhibit a mature bone marrow plasma cell gene signature whereas patients having a high risk CDGR Score value exhibit a proliferation profile (undifferentiated plasmablasts) and MYC target genes related signature.

5 The present invention relates to the use of an expression level value of each of the four markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 in a sample obtained from an individual affected with multiple myeloma for predicting outcome of multiple myeloma in the said individual.

10 This invention thus concerns the use of an expression level value of each of the four markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 in a sample obtained from an individual affected with multiple myeloma for calculating a score value that is indicative of the prognosis of multiple myeloma in the said individual.

15 Using univariate COX and multivariate COX methods, it is shown in the examples herein that measuring the expression level of the combination of CD24, CD27, CD36 and CD302 consists of a specific marker that has been found to be independent from any of the other multiple myeloma other markers tested.

20 The CD24 gene encodes a sialoglycoprotein that is expressed on mature granulocytes and B cells and modulates growth and differentiation signals to these cells. The precursor protein is cleaved to a short 32 amino acid mature peptide which is anchored via a glycosyl phosphatidylinositol (GPI) link to the cell surface. The CD24 gene nucleic acid sequence may be retrieved (i) from the HGCN database under the accession number 1645, or (ii) from the Entrez_Gene database under the accession number Gene ID: 100133941. The CD24 amino acid sequence may be retrieved from the UniProt/SwissProt database under the accession number P25063.

25 The CD27 gene encodes a member of the TNF-receptor superfamily. This receptor is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. It binds to ligand CD70, and plays a key role in regulating B-cell activation and immunoglobulin synthesis. This receptor transduces signals that lead to the activation of NF-kappaB and MAPK8/JNK. The CD27 gene nucleic acid sequence may be retrieved (i) from the HGCN database under the accession number 11922, or (ii) from the Entrez-Gene database under the accession number Gene ID 939. The CD27 amino acid sequence may be retrieved from the UniProt/SwissProt database under the accession number P26842.

30

CONFORME AU DEPOT

The CD36 gene encodes the fourth major glycoprotein of the platelet surface and serves as a receptor for thrombospondin in platelets and various cell lines. Since thrombospondins are widely distributed proteins involved in a variety of adhesive processes, this protein may have important functions as a cell adhesion molecule. It binds
5 to collagen, thrombospondin, anionic phospholipids and oxidized LDL. The CD36 gene nucleic acid sequence may be retrieved (i) from the HGCN database under the accession number 1663, (ii) from the Entrez-Gene database under the accession number Gene ID 948. The CD36 amino acid sequence may be retrieved from the UniProt/SwissProt database under the accession number P16671.

10 The CD302 gene encodes a C-type lectin receptor involved in cell adhesion and migration, as well as endocytosis and phagocytosis. The CD302 gene nucleic acid sequence may be retrieved (i) from the HGCN database under the accession number 30843, (ii) from the Entrez-Gene database under the accession number Gene ID 9936. The CD302 amino acid sequence may be retrieved from the UniProt/SwissProt database under
15 the accession number Q81X05.

The present invention also relates to an *in vitro* method for predicting outcome of multiple myeloma in an individual comprising the steps of :

- a) measuring the expression level of each the four markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 in a sample obtained from the said
20 individual,
- b) comparing the expression value measured at step a) with a reference value for each of the markers tested, and
- c) determining the predicted outcome of multiple myeloma in the said individual from the comparison performed at step b).

25 In some embodiments of the *in vitro* prediction method, step c) comprises calculating a prognostic score value, as it will be detailed further in the present specification.

As used herein, the expression level of a marker encompasses both (i) the level of expression of the corresponding gene and (ii) the level of expression of the
30 corresponding protein.

CONFORME AU DEPOT

Thus, in some embodiments, the expression level of a marker selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 consists of the level of expression of the said marker gene.

5 Also, in some embodiments, the expression level of a marker selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 consists of the level of expression of the said marker protein.

It shall be understood that, for performing the prediction or prognosis method described herein, the expression levels which are measured are either (i) exclusively the gene expression levels of each of the markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 or (ii) exclusively the protein expression levels of each of the markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302. Thus, the *in vitro* prediction method described herein does not encompass embodiments wherein the gene expression level is measured for some of the markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 and wherein the protein expression level is measured for the remaining markers.

Within the scope of the invention, “an individual” is intended to mean any mammal, such as cat, dog, preferably a human being, irrespective of its age or gender. In particular, an individual encompassed by the invention is having multiple myeloma, and therefore the term “individual” also refers to an individual that may be undergoing or not a treatment against multiple myeloma, for example radiotherapy, chemotherapy and/or immunotherapy. In a preferred embodiment of the invention, an individual refers to any patient (preferably human) afflicted with multiple myeloma. The term “multiple myeloma” refers to multiple myeloma such as revised in the World Health Organisation Classification C90.

25 Within the scope of the invention, the term "sample" is intended to mean any biological sample derived from an individual, such as a fluid, including blood, saliva; a tissue; a cell sample, an organ; a biopsy. The term “sample” encompasses a bone marrow-derived sample and a blood-derived sample. In some embodiments, a biological sample refers to multiple myeloma cells, bone marrow or medullary cells.

30 The sample may be collected according to conventional techniques in the art, and used directly for diagnosis or alternatively stored for subsequent diagnosis. A tumour sample may be fresh, frozen or paraffin- embedded.

CONFORME AU DEPOT

In the sense of the invention, “*comprising*” encompasses “*consisting of*” and “*consisting essentially of*”.

In the sense of the invention, a “*reference value*” refers to the expected gene or protein expression level in the biological sample of an individual that is either (i) a control
5 individual which is not affected with a multiple myeloma, or (ii) an individual for whom the occurrence of multiple myeloma is known or detectable. By extension, a reference value can be determined either from a single individual, or from a group of individuals.

Thus, the invention also relates to a method for screening compounds for treating, or reducing multiple myeloma in an individual, comprising at least a step of
10 determining in a biological sample of said individual the gene or protein expression levels for each of the markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302.

In some embodiments, the level of gene or protein expression of a marker selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 may be used as the sole multiple myeloma prognosis marker (i) in a method of prognosis of the outcome of
15 multiple myeloma and (ii) in a method of prognosis of the responsiveness of a patient to a therapeutic treatment of multiple myeloma.

In some embodiments, the level of expression of the markers selected in the group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 may be used in combination with one or more further multiple myeloma markers in a predicting method multiple myeloma
20 individual outcome.

Within the scope of the invention, the expression “likelihood to efficiently respond to” is meant to intend that the individual having multiple myeloma may be subjected to stabilization, an alleviating, a curing or a reduction of the progression of the symptoms or the disease itself.

25 Within the scope of the present invention, the term “symptom” is intended to mean any noticeable response of the body to a multiple myeloma condition. In practice, a symptom encompasses high levels of proteins in the blood, serum, urine, and organs, including but not limited to M-protein and other immunoglobulins (antibodies), albumin, and β_2 –microglobulin, as well as hyperviscosity, infections, anemia, hypercalcemia,
30 immunodeficiency, lytic bone lesions, and renal failure, infections, signs and symptoms of light chain amyloidosis.

CONFORME AU DEPOT

In some embodiments, individual having a multiple myeloma that efficiently respond to a treatment against multiple myeloma may be characterized by a significant reduction of the size of the tumor, a reduction of the invasive properties of the tumor cells, a reduction of the migration properties of the tumor cells, a reduction of the mean cancerous cells counts, a variation of known multiple myeloma biomarkers.

Each of these parameters may be evaluated accordingly to known methods routinely used in the art.

Within the scope of the invention, the expression “measuring the level of expression of a CD marker” is intended to mean quantitatively or semi-quantitatively measuring either the level of the corresponding CD protein expression or the level of the corresponding CD gene expression in the cells comprised within the sample. As used herein, a CD marker encompasses CD24, CD27, CD36 and CD302.

In practice, the measurement of the expression level of a CD protein may be performed accordingly to any known method in the art.

In some embodiments, said method may comprise a step of contacting the sample with a compound capable of selectively binding to the corresponding CD protein, said compound being subsequently detected. For example, a compound capable of selectively binding to a CD protein may be an antibody, such as, for example, a monoclonal antibody, or an aptamer.

In some embodiments, the level of a CD protein expression may be measured by using standard immunodiagnostic techniques, including immunoassays such as competition, direct reaction, or sandwich type assays. Such assays include, but are not limited to, agglutination tests; enzyme-labelled and mediated immunoassays, such as ELISAs; biotin/avidin type assays; radioimmunoassays; immunoelectrophoresis; immunoprecipitation; flow cytometry, immunohistochemical staining. In some embodiments, a compound capable of selectively binding to a CD protein may be immobilized onto a suitable solid support, prior to its use.

In some preferred embodiments, the level of a CD protein expression is measured by a flow cytometry method.

In embodiments wherein the expression level consists of the expression level of the said CD gene, among CD24, CD27, CD36 and CD302, any known RNA level

CONFORME AU DEPOT

measuring method may be used, and especially the Prime Flow® method of measuring the RNA level by flow cytometry may be used.

In embodiments wherein the expression level of a CD protein consists of the expression level of the said CD protein, CD24, CD27, CD36 and CD302, any known flow
5 cytometry method may be used, especially a flow cytometry method using a combination of antibodies, each antibody being specifically directed against each of the CD24, CD27, CD36 and CD302 proteins.

In some other embodiments, the level of CD protein expression may be measured by immunohistochemical staining, preferably by using a monoclonal antibody
10 directed against the corresponding CD protein.

In some embodiments, monoclonal antibodies directed against a CD protein may be prepared accordingly to any method known from the state in the art, e.g. as described in Harlow and Lane (“Antibodies: A Laboratory Manual”, 2nd Ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

In practice, in order to perform immunohistochemistry, tissue sections may be obtained from a individual and fixed onto a glass slide by any suitable fixing agent, such as e.g. alcohol, acetone, and paraformaldehyde, to which is reacted an antibody. Conventional methods for immunohistochemistry are described in Harlow and Lane (“Antibodies A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988),
15 Ausubel et al. (“Current Protocols In Molecular Biology”, John Wiley and Sons, NY, 1987) or Brauer et al. (FASEB J, 15, 2689-2701; 2001).

In some embodiments, commercially available monoclonal antibody directed against a CD protein may be suitable, such as :

- for CD24, clone ab64064 from abcam®, or clone ML5 from Biolegend®,
- 25 - for CD27, clone ab131254 from abcam®, or clone LG.3A10 from Biolegend®,
- for CD36, clone 17044 from abcam®, or clone 5-271 from Biolegend®, and
- for CD302, reference ABIN484932 from Antibodies_On_Line®, or clone SAB4300704 from Sigma Aldrich®.

In some embodiments, the measure of the level of expression of a CD protein
30 may be dependent of the intensity of the labelling obtained from the anti-CD protein antibody used and/or the number of cells expressing a noticeable amount of the said CD protein.

CONFORME AU DEPOT

In practice, the measurement of the level of a CD gene expression may be performed accordingly to any known method in the art. As used herein, CD genes encompass CD24 gene, CD27 gene, CD36 gene and CD302 gene.

5 In some embodiments, the measurement of the level of a CD gene expression is performed by the measurement of the quantity of mRNA, notably by a method routinely used in the art. In practice, the total nucleic acids fraction contained in the sample may be obtained according to standard methods, such as using lytic enzymes or chemical solutions or extracted by nucleic-acid-binding resins following the manufacturer's instructions. The extracted mRNA may be subsequently detected by hybridization (e. g., Northern blot
10 analysis) and/or amplification (e.g., RT-PCR). Preferably quantitative or semi-quantitative RT-PCR is preferred. Real-time quantitative or semi-quantitative RT-PCR is particularly advantageous.

In preferred embodiments wherein the level of a CD gene expression is performed by the measurement of the quantity of mRNA, any known RNA level
15 measuring method may be used, and especially the Prime Flow® method of measuring the RNA level by flow cytometry may be used.

In some embodiments, other methods of amplification including ligase chain reaction (LCR), transcription-mediated amplification (TMA), strand displacement amplification (SDA) and nucleic acid sequence based amplification (NASBA) may be
20 used.

In practice, probes for hybridization and/or amplification may be designed and obtained by any known method in the art.

In some other embodiments, the measurement of the level of a CD gene expression is performed by the DNA chip analysis technology (Hoheisel, Nature Reviews,
25 Genetics, 2006, 7:200-210). Such DNA chip or nucleic acid microarray consists of different nucleic acid probes that are chemically attached to a substrate, which can be a microchip, a glass slide or a microsphere-sized bead. A microchip may be constituted of polymers, plastics, resins, polysaccharides, silica or silica-based materials, carbon, metals, inorganic glasses, or nitrocellulose. Probes comprise nucleic acids such as cDNAs or
30 oligonucleotides that may be about 10 to about 60 base pairs. To determine the expression level, a sample from a test subject, optionally first subjected to a reverse transcription, is labelled and contacted with the microarray in hybridization conditions, leading to the

CONFORME AU DEPOT

formation of complexes between target nucleic acids that are complementary to probe sequences attached to the microarray surface. The labelled hybridized complexes are then detected and can be quantified or semi-quantified. Labelling may be achieved by various methods, e.g. by using radioactive or fluorescent labelling.

5 Determination of the expression level of the genes can be performed by a variety of techniques. Generally, the expression level as determined is a relative expression level. More preferably, the determination comprises contacting the biological sample with selective reagents such as probes, primers or ligands, and thereby detecting the presence, or measuring the amount, of polypeptide or nucleic acids of interest originally in the
10 biological sample. Contacting may be performed in any suitable device, such as a plate, microtiter dish, test tube, well, glass, column, and so forth. In specific embodiments, the contacting is performed on a substrate coated with the reagent, such as a nucleic acid array or a specific ligand array. The substrate may be a solid or semi-solid substrate such as any suitable support comprising glass, plastic, nylon, paper, metal, polymers and the like. The
15 substrate may be of various forms and sizes, such as a slide, a membrane, a bead, a column, a gel, etc. The contacting may be made under any condition suitable for a detectable complex, such as a nucleic acid hybrid or an antibody-antigen complex, to be formed between the reagent and the nucleic acids or polypeptides of the biological sample. In a preferred embodiment, the expression level may be determined by determining the
20 quantity of mRNA.

 Methods for determining the quantity of mRNA are well known in the art. For example the nucleic acid contained in the biological sample is first extracted according to standard methods, for example using lytic enzymes or chemical solutions or extracted by nucleic-acid-binding resins following the manufacturer's instructions. The extracted
25 mRNA is then detected by hybridization (e. g., Northern blot analysis) and/or amplification (e.g., RT-PCR). Preferably quantitative or semi-quantitative RT-PCR is preferred. Real-time quantitative or semi-quantitative RT-PCR is particularly advantageous.

 Methods for determining the quantity of mRNA by RNA sequencing may also be used.

30 Other methods of amplification include ligase chain reaction (LCR), transcription-mediated amplification (TMA), strand displacement amplification (SDA) and nucleic acid sequence based amplification (NASBA).

CONFORME AU DEPOT

Furthermore, CD24, CD27, CD36 and CD302 gene expression may be combined with flow cytometry approach using PrimeFlow® technology representing a powerful tool for risk stratification and outcome prediction in MM. The PrimeFlow® technology expands the typical flow cytometry application by allowing simultaneous
5 detection of RNA transcripts and proteins in single cells. The assay, which is notably called the **PrimeFlow™ RNA Assay**, facilitates analysis of transcript and protein expression correlations as the cell changes over time or in response to stimulus. The assay employs a fluorescent in situ hybridization (FISH) technique for simultaneous detection of up to three RNA transcripts in a single cell using a standard flow cytometer. RNA
10 detection may be teamed together with intracellular and cell surface antibody staining to elevate the understanding of single cell dynamics to a new dimension.

Illustratively, nucleic acid probes that hybridize with CD24 mRNA may be selected in group comprising RNAscope® 2.5 VS probe Ref SKU:313029 and RNAscope® 2.5 LS probe Ref SKU:313028 (Advanced Cell Diagnostics, Belgium).

15 Illustratively, nucleic acid probes that hybridize with CD27 mRNA may be selected in group comprising RNAscope® probe Ref SKU:415461 and RNAscope® 2.5 VS probe Ref SKU:415459 (Advanced Cell Diagnostics, Belgium).

Illustratively, nucleic acid probes that hybridize with CD36 mRNA comprise the CD36 probe Ref SKU:CD36-20-OR (Empire Genomics, Interchim, Montluçon,
20 France).

Illustratively, nucleic acid probes that hybridize with CD302 mRNA comprise the CD302 probe Ref SKU:CD302-20-OR (Empire Genomics, Interchim, Montluçon, France).

Nucleic acids having at least 10 nucleotides and exhibiting sequence
25 complementarity or homology to the mRNA of interest herein find utility as hybridization probes or amplification primers. It is understood that such nucleic acids need not be identical, but are typically at least about 80% identical to the homologous region of comparable size, more preferably 85% identical and even more preferably 90-95% identical. In certain embodiments, it will be advantageous to use nucleic acids in
30 combination with appropriate means, such as a detectable label, for detecting hybridization. A wide variety of appropriate indicators are known in the art including, fluorescent, radioactive, enzymatic or other ligands (e. g. avidin/biotin).

CONFORME AU DEPOT

Probes typically comprise single-stranded nucleic acids of between 10 to 1000 nucleotides in length, for instance of between 10 and 800, more preferably of between 15 and 700, typically of between 20 and 500. Primers typically are shorter single-stranded nucleic acids, of between 10 to 25 nucleotides in length, designed to perfectly or almost perfectly match a nucleic acid of interest, to be amplified. The probes and primers are “specific” to the nucleic acids they hybridize to, i.e. they preferably hybridize under high stringency hybridization conditions (corresponding to the highest melting temperature T_m , e.g., 50 % formamide, 5x or 6x SCC. SCC is a 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-citrate).

The nucleic acid primers or probes used in the above amplification and detection method may be assembled as a kit. Such a kit includes consensus primers and molecular probes. A preferred kit also includes the components necessary to determine if amplification has occurred. The kit may also include, for example, PCR buffers and enzymes; positive control sequences, reaction control primers; and instructions for amplifying and detecting the specific sequences.

In a particular embodiment, the methods of the invention comprise the steps of providing total RNAs extracted from a biological samples and subjecting the RNAs to amplification and hybridization to specific probes, more particularly by means of a quantitative or semi-quantitative RT-PCR.

In another preferred embodiment, the expression level is determined by DNA chip analysis. Such DNA chip or nucleic acid microarray consists of different nucleic acid probes that are chemically attached to a substrate, which can be a microchip, a glass slide or a microsphere-sized bead. A microchip may be constituted of polymers, plastics, resins, polysaccharides, silica or silica-based materials, carbon, metals, inorganic glasses, or nitrocellulose. Probes comprise nucleic acids such as cDNAs or oligonucleotides that may be about 10 to about 60 base pairs. To determine the expression level, a biological sample from a test patient, optionally first subjected to a reverse transcription, is labelled and contacted with the microarray in hybridization conditions, leading to the formation of complexes between target nucleic acids that are complementary to probe sequences attached to the microarray surface. The labelled hybridized complexes are then detected and can be quantified or semi-quantified. Labelling may be achieved by various methods, e.g. by using radioactive or fluorescent labelling. Many variants of the microarray

CONFORME AU DEPOT

hybridization technology are available to the man skilled in the art (see e.g. the review by Hoheisel, Nature Reviews, Genetics, 2006, 7:200-210)

In this context, the invention further provides a DNA chip comprising a solid support which carries nucleic acids that are specific to the CD24, CD27, CD36 and CD302
5 genes.

Within the scope of the invention, the expression “reference value” is intended to mean a value representing a “standard” level of expression of a selected CD gene, in conditions wherein the cells express the said CD gene at a physiological level.

In some embodiments, said reference value may be measured in a sample
10 obtained from an individual who is not affected with a multiple myeloma (“multiple myeloma-free” individual), which encompasses a healthy individual, i.e. an individual without any medical condition or any history of medical condition.

In some embodiments, said reference value may represent a mean value measured in a plurality of samples obtained from multiple myeloma-free individual(s). In
15 some embodiments, a plurality of samples encompasses at least 2, at least 3, at least 5, at least 10, at least 15, at least 25, at least 50, at least 100, at least 250, at least 500 samples. In some embodiments, one or more multiple myeloma-free individual(s) encompasses at least 2, at least 3, at least 5, at least 10, at least 15, at least 25, at least 50, at least 100, at least 250, at least 500 multiple myeloma-free individuals.

In some embodiments, the mean reference value may be gathered from a
20 plurality of samples stocked and periodically reevaluated.

In certain embodiments, said reference value may represent a mean value measured in a plurality of samples obtained from one or more individual(s) which are not affected with a multiple myeloma.

In some embodiments, a reference value may also represent a value
25 representing a “standard” level of expression of a selected CD gene, from a sample obtained from an individual who is affected with multiple myeloma.

In some embodiments, the level of a CD protein expression in one sample may be measured, e.g. by immunohistochemical staining, and further analyzed by a semi-
30 quantitative method comprising the scoring of said level of expression. In practice, cellular stains related to the combination of the selected CD24, CD27, CD36 and CD302 proteins

CONFORME AU DEPOT

in a sample may be computed and analyzed using a software, or visually analyzed, and a score may be attributed to said sample.

In some embodiments, the measured expression value of each CD marker may be classified as (i) a “high” expression value or (ii) a “low” expression value, respectively.

5 Regarding attribution of a score value, a 2 grades scoring may be attributed accordingly to the measured level of the selected CD24, CD27, CD36 and CD302 gene or protein expression, namely:

- a good outcome prognosis score when a high expression level of two or more markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 is measured,
- 10 - a bad outcome prognosis score when a low expression level of three or more markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 is measured.

 Within the scope of the invention, the expression “good outcome” encompasses any amelioration of the medical condition, including stabilization, an alleviating, reduction of the progression of the symptoms or the disease itself, an extended survival time period, an extended relapse-free time period or a total remission.

15 Within the scope of the invention, the expression “good outcome” also encompasses a benefit in term of overall survival prognosis. In some embodiments, an overall survival prognosis benefit may account for a significant gain of life expectancy.

 As also shown in the examples herein, a prognosis score corresponding to a good outcome may mean that the tested individual is at low risk and has a median event-free time period (EFS) and overall survival (OS) substantially longer than the median event-free time period (EFS) and OS of a tested individual having a prognosis score corresponding to a bad outcome.

 As shown in the examples herein, the score which may be calculated from the expression level of each CD marker of the combination of the markers CD24, CD27, CD36 and CD302 is indicative of the predicted likelihood of said individual having a multiple myeloma to efficiently respond to a therapeutic treatment against multiple myeloma, which encompasses to efficiently respond to a therapeutic treatment with a proteasome inhibitor such as bortezomib.

30 In some embodiments, an individual having a multiple myeloma responding efficiently to a therapeutic treatment may be characterized by a better efficiency of the active ingredient(s) used according to the said therapeutic treatment against multiple

CONFORME AU DEPOT

myeloma. Therapeutic treatment of multiple myeloma encompasses chemotherapy, exposure to radiation, surgery, immunotherapy, stem cell transplant and plasmapheresis.

Many different types of drugs are used to treat multiple myeloma, which encompass Melphalan, Vincristine (Oncovin), Proteasome inhibitors, Cyclophosphamide
5 (Cytoxan), Etoposide (VP-16), Doxorubicin (Adriamycin), Liposomal doxorubicin (Doxil) and Bendamustine (Treanda). Combinations of these drugs are more effective than any single drug. Often these drugs are combined with other types of drugs like corticosteroids, bisphosphonates, immunomodulating agents (drugs that will change the patient's immune response), antibodies or epigenetic agents.

10 Radiation therapy uses focused high-energy x-rays or particles that penetrate the tissues of the body to reach and destroy cancer cells. Radiation may be used to treat areas of bone damaged by myeloma that have not responded to chemotherapy and are causing pain. It's also the most common treatment for solitary plasmacytomas. The type of radiation therapy most often used to treat multiple myeloma or solitary plasmacytoma is
15 called *external beam radiation therapy*.

Although surgery is sometimes used to remove single plasmacytomas, it's rarely used to treat multiple myeloma. When spinal cord compression causes paralysis, severe muscle weakness, or numbness, emergency surgery may be needed.

In a stem cell transplant, the patient gets high-dose chemotherapy (sometimes
20 with radiation to the whole body) to kill the cells in the bone marrow (including the myeloma cells). Then the patient receives new, healthy blood-forming stem cells. When stem cell transplants were first developed, the new stem cells came from bone marrow, and so this was known as a *bone marrow transplant*. Now, stem cells are more often gathered from the blood (a peripheral blood stem cell transplant).

25 Stem cell transplant is commonly used to treat multiple myeloma. Before the transplant, drug treatment is used to reduce the number of myeloma cells in the patient's body. Stem cell transplants (SCT) encompass autologous stem cell transplants and allogeneic stem cell transplant.

In some embodiments, the outcome of multiple myeloma may be determined
30 before a medical treatment intended to cure or reduce the disease. Said outcome may be determined within few days or few months prior initiating a therapeutic treatment intended to cure or reduce multiple myeloma.

CONFORME AU DEPOT

In some embodiments, the outcome may be determined during the course of a medical treatment intended to cure or reduce multiple myeloma.

In some other embodiments, the outcome may be determined after a medical treatment intended to cure or reduce multiple myeloma. Said outcome may be determined
5 within few days or few months after the end of the said therapeutic treatment.

In some embodiments, any determination of the outcome of an individual having a multiple myeloma, by measuring the expression level of the combination of CD24, CD27, CD36 and CD302 as disclosed herein, may be undertaken in order to adjust the medical treatment, which encompasses maintaining or stopping the treatment,
10 increasing or decreasing the doses of the pharmaceutically active agent(s) to be administered, increasing or decreasing the time interval between two administrations of the pharmaceutically active agent(s).

In certain embodiments, the score that may be calculated from the values of the expression level of CD24, CD27, CD36 and CD302 as measured in step a) is indicative of
15 a good outcome for said individual.

In a one aspect, the invention relates to a use for predicting a likelihood of an individual having a multiple myeloma to efficiently respond to a therapeutic treatment against multiple myeloma, which encompasses a therapeutic treatment with a proteasome inhibitor such as bortezomib.

As shown in the examples section below, the level of expression of the combination of CD24, CD27, CD36 and CD302 is significantly correlated with the efficacy of a therapeutic treatment of multiple myeloma.
20

In some embodiments, the level of expression of the combination of CD24, CD27, CD36 and CD302 for use as a biomarker may be combined to one or more other
25 known biomarker(s) for predicting an outcome for an individual having a multiple myeloma or for predicting a likelihood of an individual having a multiple myeloma to efficiently respond to a therapeutic treatment against multiple myeloma.

In some embodiments, other biomarkers may be selected in a group comprising UAMS 70-gene (Blood, 2006, Vol. 109 : 2276-2284), IFM signature (J Clin Oncol, 2008, Vol. 26 : 4798-4805), Centrosome Index (Blood, 2008, Vol. 111 : 1603-1609), HZD cell death signature (Clin Cancer Res, 2010, Vol. 16 : 1856-1864), IL6-HMCL signature (Haematologica, 2011, Vol. 96 ; 574-582), RS score (Bioinformatics, 2013, Vol. 29 ; 1149-
30

CONFORME AU DEPOT

1157), Proliferation Index (Haematologica, 2011, Vol. 96 : 87-95), EMC 92 gene signature (Leukemia, 2012, Vol. 26 : 2406-2413) and Chromosome Instability genomic event count (CINGEC) signature (PLoS One, 2013, 8 : e66361).

5 In a one aspect, the invention relates to a use of a level of expression of the combination of CD24, CD27, CD36 and CD302 as a biomarker for determining a severity of multiple myeloma in an individual.

The simplest measure of prognosis in MM is based on blood levels of two markers: beta-2-microglobulin and albumin. In general, higher levels of beta-2-microglobulin and lower levels of albumin are associated with a poorer prognosis. This staging system is referred to as the International Staging System, or ISS.

A Revised International Staging System (R-ISS) has been developed which uses information about genetic changes in the myeloma cells to improve the prognostic value of the original ISS.

15 The Durie-Salmon staging system is an older system that divides patients into three stages: Stages I, II, and III, corresponding to low, intermediate, and high cell mass, depending upon the severity of anemia, calcium level, kidney function, presence or absence of bone lesions, and the quantity of abnormal proteins. This staging system is best used as a measure of the overall amounts of malignant plasma cells present in the patient, and is less useful as a measure of prognosis.

20 Risk stratification — The aggressiveness of MM depends upon several variables that impact disease biology. Genetic abnormalities seen in the myeloma cells are one of the strongest predictors of tumor aggressiveness. As such, all patients with newly diagnosed MM are classified as having high, intermediate, or standard risk disease based upon tumor genetics.

25 High risk disease — Approximately 15 percent of people with MM have high risk disease on cytogenetic testing. This includes patients with, for example, the following cytogenetic abnormalities: translocation t(14;16), translocation t (14;20) and deletion chromosome 17p. This type of MM is aggressive and may shorten survival. As such, patients with high risk disease are treated with more aggressive therapy.

30 Intermediate risk disease — Approximately 10 percent of people with MM have intermediate risk disease on cytogenetic testing. This includes patients with translocation t(4;14). This type of MM was previously considered to be high risk disease,

CONFORME AU DEPOT

but with appropriate therapy, patients with these findings have outcomes approaching that of standard risk MM.

Standard risk disease — All patients with MM who lack high or intermediate risk genetic abnormalities are considered to have standard risk MM. With modern therapy, patients with standard risk MM have an estimated median survival of 8 to 10 years.

In some embodiments of the *in vitro* prediction method described herein, the measured values of the expression level of the markers CD24, CD27, CD36 and CD302 are used to calculate a CD Gene Risk Score (“CDGR Score” or “CDGRS”) by taking into account Expression Level Reference (ELRI)(calculated using Maxstat algorithm) for each of the CD24, CD27, CD36 and CD302 gene markers. These parameters are listed in Table 1 hereunder.

Table 1 : list of the marker genes

| Gene Symbol | Gene ID | Reference level (ELRI) |
|-------------|-----------|------------------------|
| CD24 | 100133941 | 296 |
| CD27 | 939 | 2055 |
| CD36 | 948 | 100 |
| CD302 | 9936 | 701 |

Embodiments of the method for predicting an outcome of a multiple myeloma

As already specified elsewhere in the present specification, the level of expression of each of the markers CD24, CD27, CD36 and CD302 may be used to define a score value that is indicative of the prognosis of multiple myeloma in a tested individual. As it is also shown herein, a relevant score value based on the expression level of each of the markers CD24, CD27, CD36 and CD302 may be determined according to various methods, which encompass calculating a CD Gene Risk Score (CDGR Score or CDGRS).

In some embodiments, the CDGR score value consists of a numerical value according to which a good outcome status or a bad outcome status of the tested individual may be determined.

CONFORME AU DEPOT

In some other embodiments, the CDGR score value is directly the status of the tested patient, the said status being selected in the group consisting of (i) a good outcome status and (ii) a bad outcome status.

As it is detailed further in the present specification, a gene or protein expression value measured for each marker (i) may be labeled “High” if the measured expression value is higher than a reference value and (ii) may be labeled “Low” if the measured expression value is lower than a reference value. In some embodiments, the said reference value is a “cut-off” reference value, such as a score value which is termed (ELRi), the calculation of which is detailed further in the present specification.

According to these embodiments, a measured expression value that is higher than the reference value may be expressed as CD^{High} (encompassing CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{High}).

According to these embodiments, a measured expression value that is lower than the reference value may be expressed as CD^{Low} (encompassing CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{Low}).

Thus, in some embodiments of the *in vitro* prediction method described herein, a good outcome status may be determined at the final step of this method for the following marker status :

- CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{Low} and CD302^{Low},
- CD24^{High}, CD27^{Low}, CD36^{High} and CD302^{High},
- CD24^{High}, CD27^{Low}, CD36^{High} and CD302^{Low},
- CD24^{High}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{High},
- CD24^{Low}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{Low},
- CD24^{Low}, CD27^{High}, CD36^{Low} and CD302^{High},
- CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{High} and CD302^{High},
- CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{Low},
- CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{Low} and CD302^{High},
- CD24^{Low}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{High}, and
- CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{High}.

Also, in some embodiments of the *in vitro* prediction method described herein, a bad outcome status may be determined at the final step of this method for the following marker status :

CONFORME AU DEPOT

- CD24^{High}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{Low},
- CD24^{Low}, CD27^{High}, CD36^{Low} and CD302^{Low},
- CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{High} and CD302^{Low},
- CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{High}, and
- 5 - CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{Low}.

The present invention also relates to an *in vitro* method for predicting outcome of multiple myeloma in an individual comprising the steps of :

- (a) determining the expression level (ELi) of of each the four markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 in a sample obtained from the said individual,
- 10 (b) comparing the expression level (ELi) determined at step (a) with a predetermined reference level (ELRi)
- (c) calculating a CDGR score trough the following criteria :

15 Good outcome status:

- CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{Low} and CD302^{Low},
- CD24^{High}, CD27^{Low}, CD36^{High} and CD302^{High},
- CD24^{High}, CD27^{Low}, CD36^{High} and CD302^{Low},
- CD24^{High}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{High},
- 20 - CD24^{Low}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{Low},
- CD24^{Low}, CD27^{High}, CD36^{Low} and CD302^{High},
- CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{High} and CD302^{High},
- CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{Low},
- CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{Low} and CD302^{High},
- 25 - CD24^{Low}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{High}, and
- CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{High}.

Poor outcome status:

- CD24^{High}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{Low},
- 30 - CD24^{Low}, CD27^{High}, CD36^{Low} and CD302^{Low},
- CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{High} and CD302^{Low},
- CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{High}, and

CONFORME AU DEPOT

- CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{Low}.

(d) determining the predicted outcome of multiple myeloma in the said individual from the comparison performed at step (c).

5 The present invention further concerns an *in vitro* method for determining the efficiency of a compound for treating multiple myeloma in an individual comprising the steps of ;

- a) performing the *in vitro* prediction method described herein on a sample obtained from the said individual before treatment with the said compound, so as to determine a first prediction of outcome of multiple myeloma in the said individual,
- 10 b) performing the *in vitro* prediction method described herein on a sample obtained from the said individual after treatment with the said compound, so as to determine a second prediction of outcome of multiple myeloma in the said individual,
- c) determining if the second prediction means a better outcome than the first prediction.

15 The present invention also pertains to an *in vitro* method for determining the efficiency of a compound for treating multiple myeloma in an individual comprising the steps of ;

- (a) determining the expression level (ELi) of of each the four markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 in a sample obtained from the said individual,
- 20 (b) comparing the expression level (ELi) determined at step (a) with a predetermined reference level (ELRi)
- (c) calculating a CDGR score trough the following criteria :

25 Good response status:

- CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{Low} and CD302^{Low},
- CD24^{High}, CD27^{Low}, CD36^{High} and CD302^{High},
- CD24^{High}, CD27^{Low}, CD36^{High} and CD302^{Low},
- CD24^{High}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{High},
- 30 - CD24^{Low}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{Low},
- CD24^{Low}, CD27^{High}, CD36^{Low} and CD302^{High},
- CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{High} and CD302^{High},

CONFORME AU DEPOT

- CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{Low},
- CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{Low} and CD302^{High},
- CD24^{Low}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{High}, and
- CD24^{High}, CD27^{High}, CD36^{High} and CD302^{High}.

5

Poor response status:

- CD24^{High}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{Low},
- CD24^{Low}, CD27^{High}, CD36^{Low} and CD302^{Low},
- CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{High} and CD302^{Low},
- 10 - CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{High}, and
- CD24^{Low}, CD27^{Low}, CD36^{Low} and CD302^{Low}.

(d) determining the predicted response status of multiple myeloma in the said individual from the comparison performed at step (c).

15

In some embodiments, the said therapeutic treatment comprises a treatment with a proteasome inhibitor such as bortezomib, mephalan, or with a combination therapy such as with a combination of dexamethasone and an immunomodulatory drug, a combination of bortezomib, mephalan and prednisone, a combination of mephalan, prednisone and thalidomide, as illustrative embodiments.

20

Predetermined reference values ELR_i used for comparison may consist of "cut-off" values.

For example; each reference ("cut-off") value ELR_i for each gene selected in a group consisting of the CD24 gene, the CD27 gene, the CD36 gene and the CD302 gene may be determined by carrying out a method comprising the steps of:

25

- a) providing a collection of samples from patients suffering of multiple myeloma;
- b) determining the expression level of the relevant gene for each sample contained in the collection provided at step a);
- c) ranking the samples according to said expression level
- d) classifying said samples in pairs of subsets of increasing, respectively decreasing,
- 30 number of members ranked according to their expression level,

CONFORME AU DEPOT

e) providing, for each sample provided at step a), information relating to the actual clinical outcome for the corresponding cancer patient (i.e. the duration of the event-free survival (EFS) or the overall survival (OS) or both);

5 f) for each pair of subsets of tumour tissue samples, obtaining a Kaplan Meier percentage of survival curve;

g) for each pair of subsets of tumour tissue samples calculating the statistical significance (p value) between both subsets

h) selecting as reference value ELR for the expression level, the value of expression level for which the p value is the smallest.

10 For example, the expression level of a gene G_i selected in the group consisting of CD24 gene, CD27 gene, CD36 gene and CD302 gene has been assessed for 100 samples of 100 patients. The 100 samples are ranked according to the expression level of gene G_i . Sample 1 has the highest expression level and sample 100 has the lowest expression level. A first grouping provides two subsets: on one side sample Nr 1 and on
15 the other side the 99 other samples. The next grouping provides on one side samples 1 and 2 and on the other side the 98 remaining samples etc., until the last grouping: on one side samples 1 to 99 and on the other side sample Nr 100. According to the information relating to the actual clinical outcome for the corresponding cancer patient, Kaplan Meier curves are prepared for each of the 99 groups of two subsets. Also for each of the 99 groups, the p
20 value between both subsets was calculated. The reference value ELR_i is then selected such as the discrimination based on the criterion of the minimum p value is the strongest. In other terms, the expression level corresponding to the boundary between both subsets for which the p value is minimum is considered as the reference value. It should be noted that according to the experiments made by the inventors, the reference value ELR_i is not
25 necessarily the median value of expression levels.

In some embodiments, the reference value ELR_i for the genes are described in **Table 1** (right column).

The invention also relates to a kit for performing the methods as above described, wherein said kit comprises means for measuring the expression level of the
30 genes or proteins selected in the group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302. Typically the kit may include a primer, a set of primers, a probe, a set of probes, a method of sequencing, as a set of antibodies above described. In a particular embodiment, the

CONFORME AU DEPOT

probe or set of probes are labelled as above described. The kit may also contain other suitably packaged reagents and materials needed for the particular detection protocol, including solid-phase matrices, if applicable, and standards.

5 In some embodiments, the CDGR score may be generated by a computer program.

Methods of treatment

10 The method of the invention allows to define a subgroup of patients who will be responsive (“responder”) or not responsive (“non responder”) to a treatment with a therapeutic compound, which encompasses a proteasome inhibitor such as bortezomib, mephalan, or with a combination therapy such as with a combination of dexamethasone and an immunomodulatory drug, a combination of bortezomib, mephalan and prednisone, a combination of mephalan, prednisone and thalidomide, as illustrative embodiments.

15 A further object of the invention relates to a method for the treatment of multiple myeloma in a patient in need thereof.

In the context of the invention, the term "treating" or "treatment", as used herein, means reversing, alleviating, inhibiting the progress of, or preventing the disorder or condition to which such term applies, or one or more symptoms of such disorder or
20 condition.

In some embodiments, the method comprises the following steps

- a) testing whether the patient will respond or not to a therapeutic compound by performing the *in vitro* prediction method described herein,
- b) administering the said therapeutic compound, if said patient has as a CDGR score
25 related to high risk (i.e. the patient will respond to the said therapeutic compound).

In some embodiments, the said therapeutic compound is a proteasome inhibitor such as bortezomib.

A further object of the invention relates to a therapeutic compound for use in the treatment of multiple myeloma in a patient in need thereof, wherein the patient was
30 being classified as responder to the said therapeutic compound by the *in vitro* prediction method disclosed herein.

The invention will be further illustrated, without being limited to, by the following figures and examples.

EXAMPLES

5 A. MATERIAL AND METHODS

A.1. Patient samples and gene expression data

Data of two independent cohorts of previously untreated MM patients was used. The training cohort consists of 206 MM patients and is termed the Heidelberg-Montpellier (HM)-cohort. The samples were obtained after written informed consent in
10 accordance with the Declaration of Helsinki and after approval of the ethics committee of Montpellier and Heidelberg. These data are publicly available through ArrayExpress database (E-MTAB-372). The validation cohort contains 345 MM patients from the University of Arkansas for Medical Sciences (UAMS, Little Rock, AR, USA) and is referred as TT2-cohort. These data can be accessed at the online Gene Expression
15 Omnibus (GSE2658). The clinical characteristics of the cohorts have been previously described (Moreaux et al., 2012, *Mol Cancer Ther.*; 11(12):2685-92 Hose et al, *Haematologica.*, 2011 Jan;96(1):87-95.). GEP data from a cohort of 282 patients included in the Dutch-Belgian/German HOVON-65/ GMMG-HD4 trial have been used (accession number GSE19784). The clinical characteristics of this cohort have been previously
20 described (*Leukemia.*, 2012 Nov;26(11):2406-13). Affymetrix data of 152 relapsed MM patients subsequently treated with bortezomib (GSE9782) from the study by Mulligan *et al.* were also used.

A.2. Gene expression profiling and statistical analyses

25 Gene expression data were analysed with SAM (Significance Analysis of Microarrays). Probe sets were selected for prognostic significance using Maxstat R function and Benjamini Hochberg multiple testing correction. The statistical significance of differences in overall survival (OS) and EFS between groups of patients was calculated by the log-rank test. Multivariate analysis was performed using the Cox proportional
30 hazards model. Survival curves were plotted using the Kaplan-Meier method. All these analyses have been done with R.2.10.1 and Bioconductor version 2.5.

A.3. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

The gene expression levels from high risk CD-score versus low risk CD-score MM patients were compared and the genes which had significant different expression for GSEA were picked up. Gene set enrichment analysis was carried out by computing
5 overlaps with canonical pathways and gene ontology gene sets obtained from the broad institute.

B. RESULTS

Example 1 : Prognostic value of CD genes in multiple myeloma and building of a CD gene risk score

Using the Maxstat R function and Benjamini Hochberg multiple testing correction, 4 genes (CD24, CD27, CD36 and CD302) were associated with a prognostic value in two independent cohorts of patients (HM cohort, n=206 and UAMS TT2 cohort,
15 n=345). A high expression of CD24, CD27, CD36 and CD302 is associated with a good prognosis.

These 4 prognostic CD genes were used to create a CD gene risk score. To combine the prognostic information of CD24, CD27, CD36 and CD302, a simple staging scoring was built splitting patients in 5 groups according to CD24, CD27, CD36 and
20 CD302 expression. Group 1 comprised patients with CD24, CD27, CD36 and CD302 low expression, group 2 included patients with high expression of 1 out of the 4 genes. The group 3 consisted of patients with high expression of 2 out of the 4 genes, group 4 comprised patients with high expression of 3 out of the 4 genes and the group 5 consisted of patients with a high expression of CD24, CD27, CD36 and CD302. Kaplan Meier
25 analysis of the 5 different groups was performed. When 2 consecutive groups shown no significant difference, they were merged. This approach resulted in two groups with different OS. Group 1 comprised 72.8% of patients with a high expression of all or 2 or 3 out of the 4 CD genes and group 2 comprised 27.2% of patients with a high expression of 1 out of 4 CD genes or a low expression of all CD genes (Figure 1). Group 1 (low risk) had a
30 not reached median OS and group 2 (high risk) had a median OS of 50.6 months ($P = 2.06E-6$) (Figure 1).

CONFORME AU DEPOT

The prognostic value of the CD gene risk score was validated in two independent cohorts of patient (LR-TT2 cohort; n=345 patients and Hovon cohort n=282) with a not reached median OS for group 1 and a 55.5 months median OS for group 2 ($P = 1.6E-6$) in LR-TT2 cohort and a 33.4 months median OS for group 2 in Hovon cohort ($P = 1.1E-5$) (Figures 2 and 3).

The CD-score could also predict for EFS in the HM cohort ($P = 3.3E-5$) (Figure 5). This prognostic value was validated in the LR-TT2 cohort ($P = .0001$) and the Hovon cohort ($P = .01$) (Figures 6 and 7).

We investigated if the CD-score could have a prognostic value for patients at relapse. Using a cohort of relapsing patients treated by bortezomib, the CD-score remained a prognostic factor separating patients in two groups with significantly different OS (median OS of 11.3 months for the high-risk group and 23.8 months for the low-risk group; $P = 0.0001$) (Figure 4).

15 **Example 2 : COX univariate and multivariate analyses of CD gene risk score**

The CD-score prognostic value was compared with conventional prognostic factors and other gene-based risk score. In univariate COX analysis, CD-score, ISS (Greipp et al., 2005, J Clin Oncol, Vol. 23 : 3412-3420), β 2M, Albumin, t(4;14), del17p, HRS (Shaughnessy et al., 2007, Blood, Vol. 109 : 2276-2284), IFM (Decaux et al., 2008, J Clon Oncol, Vol. 26 : 4798-4805), GPI (Hose et al., 2011, Haematologica, Vol. 69 : 87-95) and RS (Rème et al., 2013, Bioinformatics, Vol. 29 : 1149-1157) have prognostic value (Table 2A).

When analysed 2 by 2, CD-score tested with ISS, β 2M, t(4; 14), HRS, GPI and RS remained independent in the HM cohort (Table 3). In the LR-TT2 cohort, CD-score, remained significant when tested with t(4;14), HRS, IFM score, GPI and RS (Table 2B).

When all parameters were tested together, CD-score, β 2M, t(4; 14), IFM score and RS score remained significant in the HM cohort. In the LR-TT2 cohort, CD-score, t(4; 14) and HRS remained independent prognostic factors (Table 2C).

30 **Table 2: Cox univariate and multivariate analysis of overall survival (OS) in HM and TT2 patients' cohorts.**

CONFORME AU DEPOT**Table 2A**

| Univariate COX analysis | | HM-cohort | | TT2-cohort | |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
| | | | | | |
| Overall Survival | | OS | | OS | |
| | Pronostic variable | Proportional hazard ratio | <i>P</i> -value | Proportional hazard ratio | <i>P</i> -value |
| | CD- score | 0,25 | <0.0001 | 0,49 | <0.0001 |
| | ISS | 1,84 | 0,002 | NA | NA |
| | B2m | 1,1 | <0.0001 | NA | NA |
| | t(4 ;14) | 3,32 | <0.0001 | 2,21 | 0,001 |
| | del17p | 3,44 | 0,02 | NA | NA |
| | HRS | 2,37 | 0,01 | 4,67 | <0.0001 |
| | IFM score | 2,49 | 0,01 | 1,78 | 0,004 |
| | GPI | 2,54 | <0.0001 | 1,75 | <0.0001 |
| | RS | 4,16 | <0.0001 | 1,91 | <0.0001 |

CONFORME AU DEPOT**Table 2B**

| 2 by 2 Multivariate COX analysis | | HM-cohort | | TT2-cohort | |
|---|-----------------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
| | | OS | OS | OS | OS |
| Overall Survival | | Proportional hazard ratio | <i>P</i> -value | Proportional hazard ratio | <i>P</i> -value |
| | Pronostic variable | | | | |
| | CD- score | 0,27 | <0.0001 | NA | NA |
| | ISS | 1,75 | 0,008 | NA | NA |
| | CD- score | 0,27 | <0.0001 | NA | NA |
| | B2m | 1,1 | 0,002 | NA | NA |
| | CD- score | 0,25 | <0.0001 | 0,49 | <0.0001 |
| | t(4 ;14) | 3,12 | 0,001 | 2,25 | <0.0001 |
| | CD- score | 0,24 | <0.0001 | NA | NA |
| | del17p | 2,51 | NS | NA | NA |
| | CD- score | 0,21 | <0.0001 | 0,63 | 0,006 |
| | HRS | 3,11 | 0,002 | 3,68 | <0.0001 |
| | CD- score | 0,26 | <0.0001 | 0,43 | <0.0001 |
| | IFM score | 1,89 | NS | 1,58 | 0,04 |
| | CD- score | 0,28 | <0.0001 | 0,52 | <0.0001 |
| | GPI | 2,29 | 0,001 | 1,5 | 0,009 |

CONFORME AU DEPOT

| | | | | | |
|---|--------------|------------------|---------|-------------------|---------|
| 2 by 2 Multivariate COX analysis | | HM-cohort | | TT2-cohort | |
| Overall Survival | | OS | | OS | |
| | CD- score | 0,37 | 0,002 | 0,56 | <0.0001 |
| | RS | 3,42 | <0.0001 | 1,68 | <0.0001 |

Table 2C

| | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------|
| Multivariate COX analysis | | HM-cohort | | TT2-cohort | |
| Overall Survival | | OS | | OS | |
| | Pronostic variable | Proportional hazard ratio | <i>P</i> - value | Proportional hazard ratio | <i>P</i> -value |
| | CD- score | 0,27 | 0,001 | 0,63 | 0,007 |
| | ISS | 1,38 | NS | NA | NA |
| | B2m | 1,1 | 0,03 | NA | NA |
| | t(4 ;14) | 3,01 | 0,01 | 2,07 | 0,003 |
| | del17p | 1,26 | NS | NA | NA |
| | HRS | 2,04 | NS | 2,93 | <0.0001 |
| | IFM score | 0,28 | 0,03 | 0,95 | NS |
| | GPI | 1,47 | NS | 1,18 | NS |
| | RS | 2,48 | 0,02 | 1,1 | NS |

CONFORME AU DEPOT

Example 3 : MMC of patients in low-risk CD-score group have a mature bone marrow plasma cell gene signature whereas MMC from patients in high risk CD-score group are characterized by proliferation and MYC target genes related signature.

5 Gene set enrichment analysis was performed to compare gene expression profiles of patient's MMC in high- and low-risk CD-score groups (n=71 and n=135 respectively within the HM cohort).

 Genes related to mature bone marrow plasma cells ($P=0.003$) and to normal bone marrow plasma cells ($P=0.01$) were significantly enriched in low-risk CD-score
10 group ()).

 Patients of the high-risk CD-score group were characterized by a significant enrichment of genes related to undifferentiated plasma blasts ($P<0.0001$), MYC target genes ($P=0.01$) and myeloma ($P=0.01$).

15 Altogether, the experimental data disclosed herein report a CD gene based risk score (including CD27, CD24, CD302 and CD36) with a prognostic value in three independent cohorts of patients. Patients in low-risk CD score group have a significant enrichment of genes related to mature BPMC microenvironment-dependent. However, high-risk CD-score patient group overexpressed genes associated with undifferentiated
20 cancer cells.

 In high-risk CD-score patient group is also associated with pathways related to TFRC and MYC genes. These two genes are known to be involved in proliferation of MMC. TFRC (CD71), the transferrin receptor, is involved in cellular iron uptake and cell growth. CD71 is expressed at low level in normal cells and is upregulated in proliferative
25 cells (Loisel et al., 2011), its expression can be correlated to disease progression (Daniels et al., 2012). Anti-CD71 conjugated with avidin showed antitumor activity and long-term survival in MM xenograft mouse models (Daniels et al., 2011). MYC is a proto-oncogene dysregulated or overexpressed in many cancers particularly in MM where it has a prominent role in pathogenesis. MYC encodes a transcriptional factor that regulates cell
30 proliferation, growth, protein translation, metabolism and apoptosis. MYC rearrangements are observed in 15% of MM patients at diagnosis and relapse. Upregulation of MYC is

CONFORME AU DEPOT

associated with disease progression, evolution from MGUS to MM and poor prognosis (Glitza et al., 2015, Leuk Lymphoma, Vol. 56 : 602-607).

CLAIMS

1. The use of an expression level value of each of the four markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 in a sample obtained from an individual
5 affected with multiple myeloma for predicting outcome of multiple myeloma in the said individual.

2. An *in vitro* method for predicting outcome of multiple myeloma in an individual comprising the steps of :
 - 10 a) measuring the expression level of each the four markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 in a sample obtained from the said individual,
 - b) comparing the expression value measured at step a) with a reference value for each of the markers tested, and
 - 15 c) determining the predicted outcome of multiple myeloma in the said individual from the comparison performed at step b).

3. The *in vitro* method according to claim 2, wherein step c) comprises calculating a prognostic score value.
20

4. The *in vitro* method according to any one of claims 2 and 3, wherein the expression level of a marker selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 consists of the level of gene expression of the said marker.

- 25 5. The *in vitro* method according to any one of claims 2 and 3, wherein the expression level of a marker selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 consists of the level of protein expression of the said marker.

6. The *in vitro* method according to any one of claims 1 to 5, wherein a high expression
30 level of two or more markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 is indicative of a good outcome of multiple myeloma in the said individual.

CONFORME AU DEPOT

7. The *in vitro* method according to any one of claims 1 to 5, wherein a low expression level of three or more markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 is indicative of a bad outcome of multiple myeloma in the said individual.
- 5 8. The *in vitro* method according to any one of claims 1 to 7, wherein the said sample is selected in a group comprising a bone marrow-derived sample and a blood-derived sample.
9. A method for determining the efficiency of a compound for treating a multiple myeloma in an individual comprising the steps of;
- 10 a) performing the *in vitro* method according to any one of claims 2 to 8 on a sample obtained from the said individual before treatment with the said compound, so as to determine a first prediction of outcome of multiple myeloma in the said individual,
- b) performing the *in vitro* method according to any one of claims 2 to 8 on a sample obtained from the said individual after treatment with the said compound, so as to
- 15 determine a second prediction of outcome of multiple myeloma in the said individual,
- c) determining if the second prediction means a better outcome than the first prediction.

ABSTRACT

« Method for the prognosis of multiple myeloma »

The present invention relates to the use of an expression level value of each of the four markers selected in a group consisting of CD24, CD27, CD36 and CD302 in a sample obtained from an individual affected with a multiple myeloma for predicting an outcome of a multiple myeloma in the said individual.

NO ABSTRACT FIGURE

CONFORME AU DEPOT

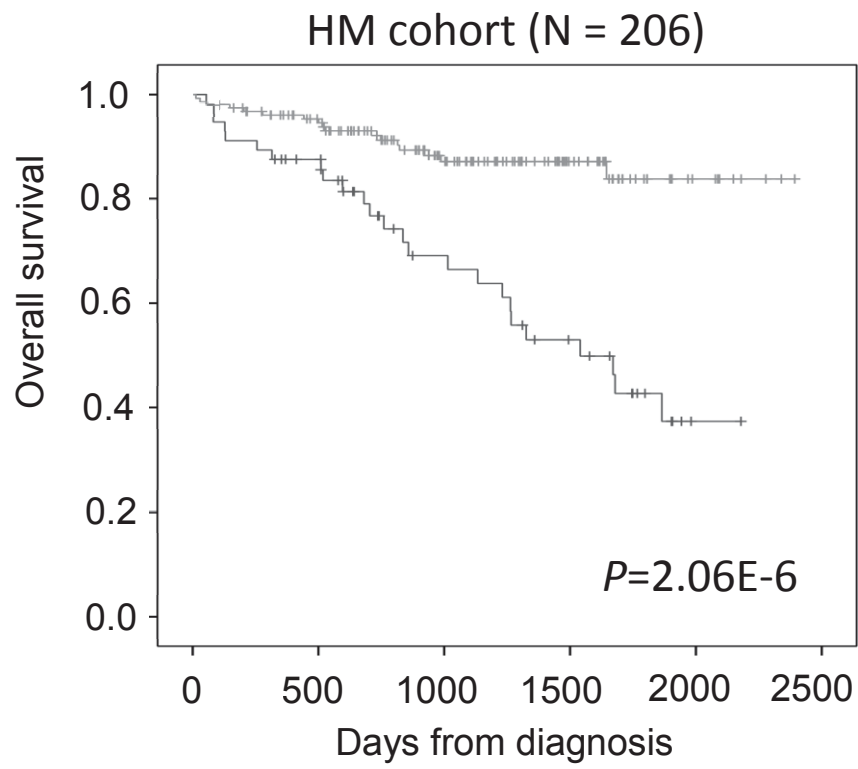


Figure 1

CONFORME AU DEPOT

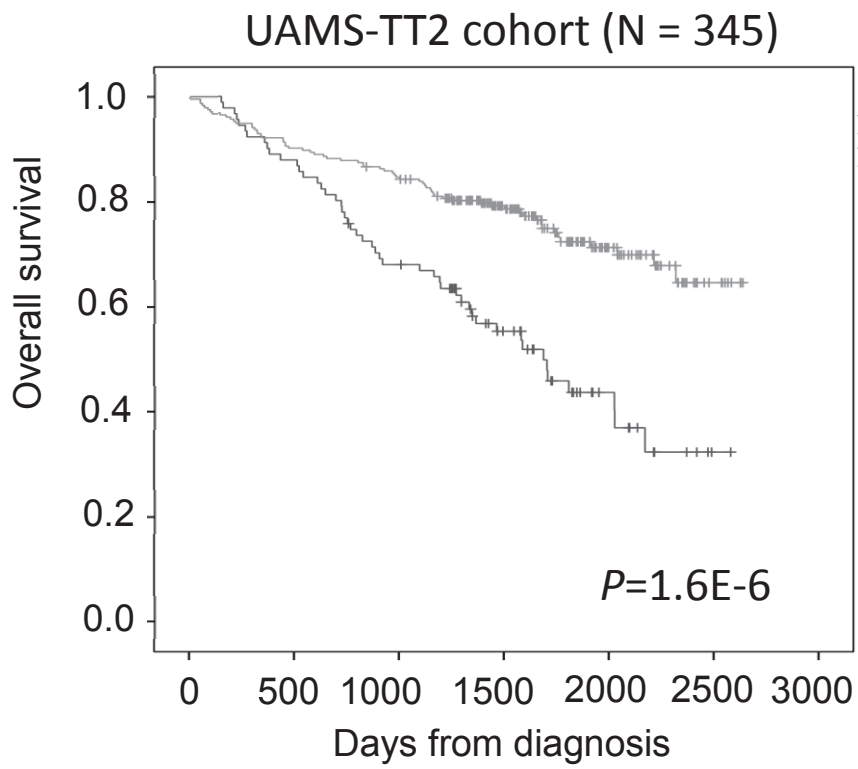
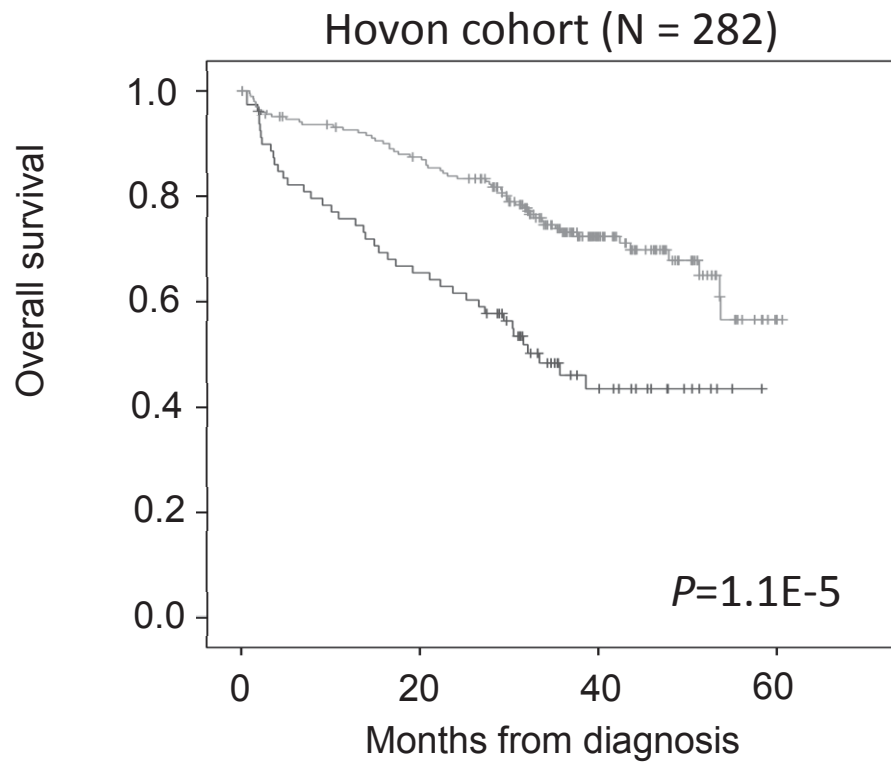


Figure 2

CONFORME AU DEPOT**Figure 3**

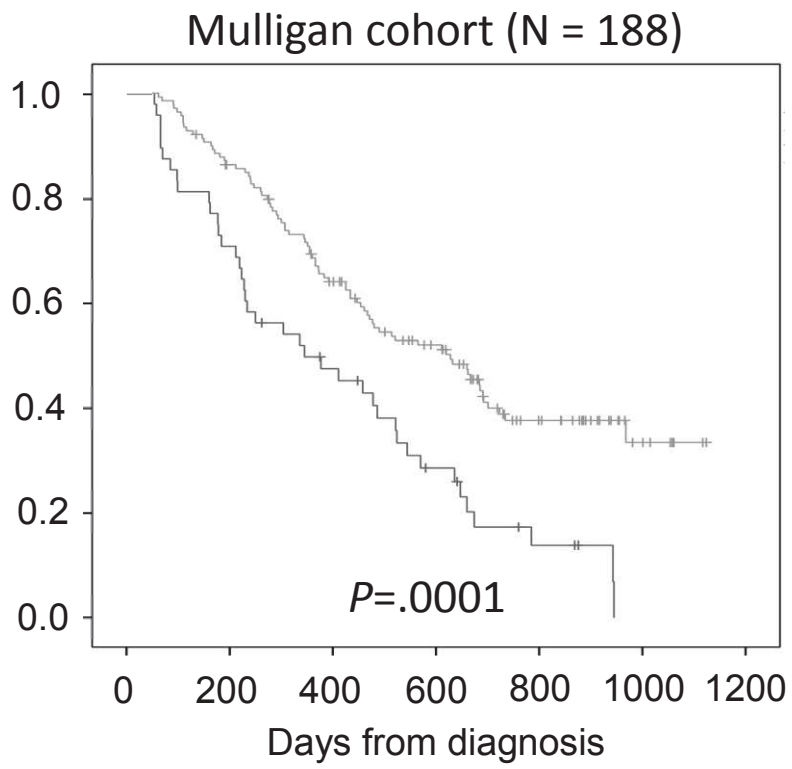
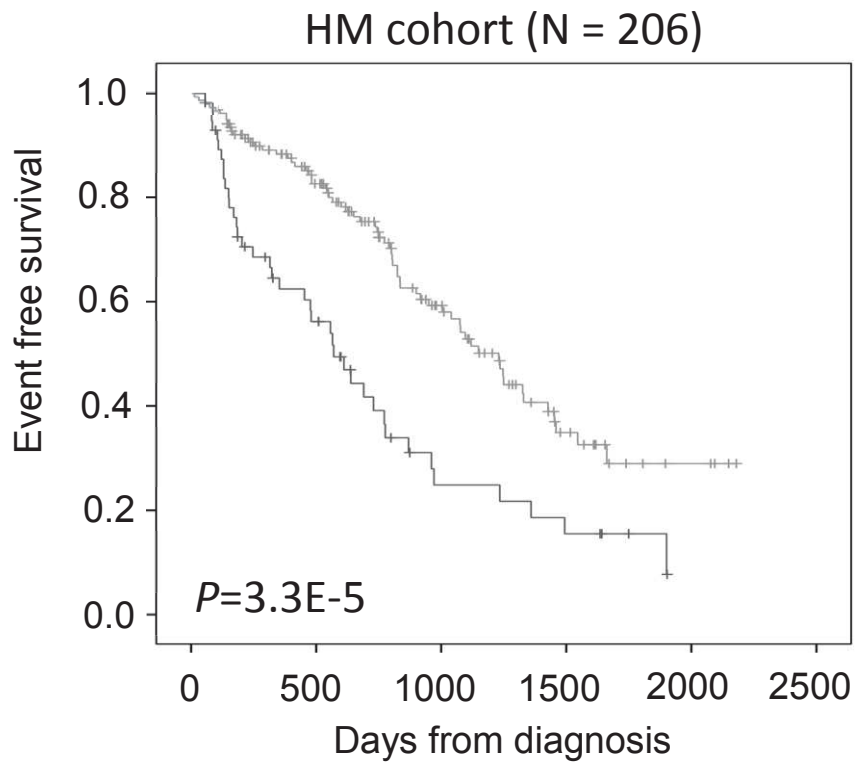
CONFORME AU DEPOT

Figure 4

CONFORME AU DEPOT**Figure 5**

CONFORME AU DEPOT

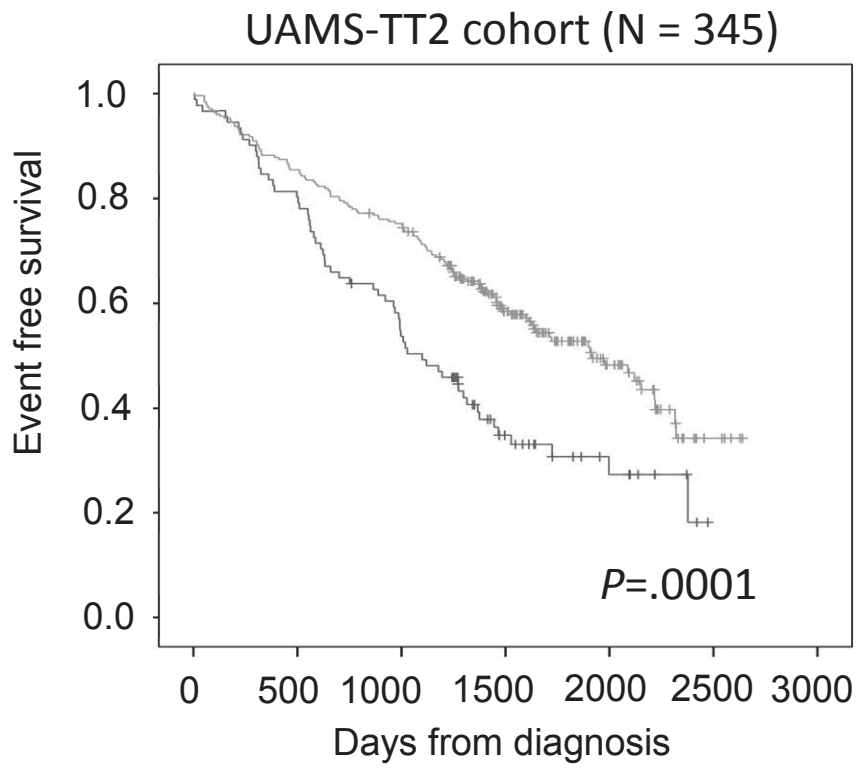


Figure 6

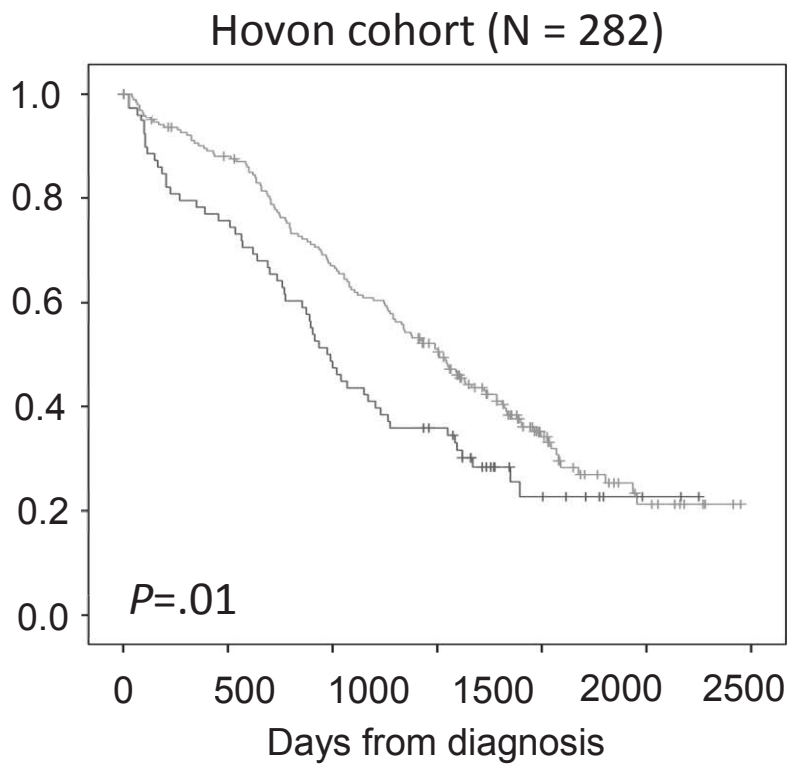
CONFORME AU DEPOT

Figure 7

Annexe 2

Brevet 2. Détection de la maladie résiduelle du myélome multiple

Jérôme Moreaux, Bernard Klein, Guilhem Requirand, Sébastien Raimbault, **Elina Alaterre** et Jean-Michel Garcia

Demande prioritaire de brevet (FR n° 1654514), déposée le 20/05/2016

Résumé de l'invention

L'invention a pour objet un procédé de détection par CFM de la présence de cellules plasmocytaires normales et de cellules plasmocytaires tumorales dans un échantillon de cellules d'un patient, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) La mise en contact dudit échantillon de cellules avec :
 - Un marqueur de la chaîne kappa, un marqueur de la chaîne lambda, et un marqueur choisi parmi : un marqueur de CD38 et un marqueur de CD138, chacun des trois marqueurs émettant un signal différent,
 - Un ou plusieurs marqueurs de cellules plasmocytaires tumorales, chacun de ces un ou plusieurs marqueurs émettant un signal différent des trois premiers signaux,
 - Un ou plusieurs marqueurs de cellules plasmocytaires normales, chacun de ces un ou plusieurs marqueurs émettant un signal différent des quatre premiers signaux,
- b) La détection des cellules plasmocytaires caractérisées par :
 - Un signal positif avec un marqueur de CD38 ou un marqueur de CD138, et
 - Un signal positif avec un marqueur de la chaîne kappa ou un marqueur de la chaîne lambda,
- c) La détection des cellules plasmocytaires tumorales parmi les cellules plasmocytaires détectées à l'étape b) avec au moins un des critères suivants (les autres plasmocytes étant considérés comme normaux) :
 - Signal positif avec au moins un marqueur spécifique de cellules plasmocytaires tumorales, et/ou
 - Un signal négatif ou significativement réduit avec au moins un marqueur de cellules plasmocytaires normales,
- d) L'analyse des résultats obtenus lors des étapes b) et c) et la quantification des cellules plasmocytaires normales et des cellules plasmocytaires tumorales.

La présente invention se situe dans le domaine du diagnostic ou d'aide au diagnostic et du suivi de la maladie résiduelle des hémopathies malignes et a pour objet un procédé de détection de cellules plasmocytaires tumorales et un procédé de diagnostic ou d'aide au diagnostic et de suivi de gammopathies monoclonales.

5 Le myélome multiple (MM) ou maladie de Kahler est une hémopathie maligne caractérisée par l'accumulation de plasmocytes tumoraux (lymphocytes B) dans la moelle osseuse, et l'accumulation d'une immunoglobuline monoclonale complète ou d'une chaîne légère monoclonale. Cette pathologie touche 2 000 nouveaux patients par an en France, 19 000 en Europe, 19 000 aux Etats-Unis. L'espérance de survie
10 médiane des patients d'âge inférieur ou égal à 65 ans est de 6-7 ans. Le diagnostic du MM inclut des signes osseux, une vitesse de sédimentation augmentée, la présence d'une immunoglobuline monoclonale et par un myélogramme montrant :

- la présence de plasmocytes dystrophiques (cytoplasme normal mais anomalies cytologiques nucléaires (cellules multinuclées, mitose multiple ou
15 atypique)) ; et
- une plasmocytose, à savoir soit l'existence d'une plasmocytose supérieure ou égale à 10 % (critère mineur), soit dans certains cas une plasmocytose supérieure à 30 % (critère majeur, pathologie sévère).

Le MM est précédé dans tous les cas d'une gammopathie monoclonale bénigne
20 (MGUS de l'anglais Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance). Les MGUS sont détectées chez 2 à 4% des sujets de 60 ans, 10% des sujets de 70 ans, 20% des sujets de 80 ans. Les MGUS évoluent vers un MM avec un taux de transformation de 1% par an, indépendant de la date de diagnostic de la MGUS.

Le MM représente 1% des nouveaux cas de cancer par an, 10 à 15% des hémopathies
25 malignes et est la seconde hémopathie maligne la plus fréquente après le lymphome non-Hodgkinien. De plus, les coûts associés à son traitement sont parmi les plus élevés.

Les données récentes de la littérature montrent que l'identification et la
30 caractérisation des cellules plasmocytaires tumorales et normales chez un patient atteint de MM fournissent un marqueur fiable de la réponse au traitement. Le groupe du Pr San Miguel (Paiva et al., 2014) a montré que, lorsqu'il y a moins d'1 cellule plasmocytaire tumorale pour 10 000 cellules leucocytaires totales (avec une

sensibilité de 10^{-4}) trois mois après une chimiothérapie à haute dose suivie d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques, les patients ont une survie significativement augmentée. Le ratio plasmocytes tumoraux/plasmocytes normaux est un facteur pronostique indépendant des marqueurs pronostiques usuels (Mateo et al., 2008). L'index de prolifération des plasmocytes tumoraux, calculé par cytométrie de flux, est également un puissant facteur pronostique. Il peut être décisif pour évaluer si un patient est en rechute active ou non. Le taux médian de cellules en phase S est de 1% chez un malade (Paiva et al., 2012b) et est augmenté chez les patients en rechute.

10 Par ailleurs, la maladie résiduelle du myélome multiple (MRD - ou en Anglais « Minimal Residual Disease ») désigne la persistance de cellules tumorales résiduelles après traitement. Les plasmocytes représentent jusqu'à 5% des cellules dans la moelle, et la présence de MRD est définie par la présence d'au moins 50 cellules plasmocytaires tumorales pour 500 000 cellules leucocytaires totales, soit 0,01% des
15 cellules (Rawstron et al., 2013).

La durée de survie médiane d'un patient est de 7 mois sans traitement, de 3 à 4 ans avec un traitement par chimiothérapie conventionnelle et de 6 à 7 ans par un traitement avec chimiothérapie à haute dose et autogreffe. Ainsi, le suivi de la MRD après traitement est également très important afin de détecter au plus tôt la
20 rechute et améliorer la prise en charge thérapeutique.

A ce jour, il existe différentes méthodes pour détecter la MRD, par exemple le « Deep Sequencing », la PCR (« Polymerase Chain Reaction ») quantitative avec des amorces spécifiques et la cytométrie en flux multiparamétrique (MFC - « Multiparametric Flow Cytometry ») (Martinez-Lopez et al., 2014b; Paiva et al.,
25 2008). Les deux premières méthodes ont une sensibilité importante, cependant elles restent très coûteuses, longues et sont difficilement automatisables. Ainsi, la cytométrie en flux multicolore est à l'heure actuelle la méthode la plus adaptée pour évaluer la réponse des patients, pour détecter précocement la rechute et améliorer la prise en charge thérapeutique afin de maximiser le ratio bénéfice/coût
30 du traitement.

Etant donné la très faible quantité de plasmocytes normaux présents dans la moelle osseuse, soit en valeur médiane 0,44% des cellules mononuclées chez un donneur sain, ceci nécessite d'acquérir un grand nombre d'événements cellulaires pour minimiser les erreurs statistiques.

Actuellement, une méthodologie mise en place par le laboratoire STI (Caraux et al., 2010, 2012) prend 2 jours, soit 16 heures de travail, pour rendre un résultat aux cliniciens.

Il existe donc un réel besoin de développer de nouveaux procédés et compositions pour le diagnostic et le suivi de l'évolution de cette maladie, et notamment d'améliorer la sensibilité et la fiabilité des tests de détection des plasmocytes tumoraux, tout en diminuant les coûts.

Les inventeurs ont mis au point une méthode de détection des plasmocytes tumoraux présentant une très grande sensibilité, reproductibilité et fiabilité.

La méthode selon l'invention permet, grâce à l'utilisation d'une combinaison particulière de marqueurs de cellules plasmocytaires tumorales et normales, d'obtenir des résultats de détection des plasmocytes normaux et tumoraux étant au moins équivalents à ceux obtenus à partir des méthodes de détection déjà connues dans l'état de l'art.

Par rapport aux méthodes de l'état de l'art, le procédé selon l'invention présente l'avantage de pouvoir être réalisé dans un contenant unique, tel qu'un tube ou un puits d'une plaque à puits, comprenant l'échantillon à analyser et les différents marqueurs. Ceci présente en particulier l'avantage d'être moins coûteux, de diminuer la durée et la complexité des différentes étapes expérimentales, et de réduire le délai d'obtention des résultats. Ainsi, la méthode selon l'invention permet de diminuer les besoins en personnel qualifié et les risques d'erreurs associés, augmentant ainsi dans le même temps la fiabilité de la méthode. De plus, la diminution de la complexité des différentes étapes expérimentales du procédé selon l'invention permet d'améliorer la reproductibilité et d'augmenter la productivité.

25

L'invention a pour objet un procédé de détection par cytométrie en flux de la présence de cellules plasmocytaires normales et de cellules plasmocytaires tumorales dans un échantillon de cellules d'un patient, ledit procédé comprenant les étapes suivantes:

30

a) la mise en contact dudit échantillon de cellules avec :

- un marqueur de la chaîne κ , un marqueur de la chaîne λ , et un marqueur choisi parmi : un marqueur de CD38 et un marqueur de CD138, chacun des trois marqueurs émettant un signal différent,

- un ou plusieurs marqueur(s) de cellules plasmocytaires tumorales, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des trois premiers signaux,
 - un ou plusieurs marqueur(s) de cellules plasmocytaires normales, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des quatre premiers signaux,
- 5
- b) la détection des cellules plasmocytaires caractérisées par :
- un signal positif avec un marqueur de CD38 ou un marqueur de CD138, et
 - un signal positif avec un marqueur de la chaîne κ ou un marqueur de la chaîne
- 10 λ ,
- c) la détection des cellules plasmocytaires tumorales parmi les cellules plasmocytaires détectées à l'étape b) avec au moins un des critères suivants (les autres plasmocytes étant considérés comme normaux) :
- signal positif avec au moins un marqueur spécifique de cellules plasmocytaires tumorales, et/ou
 - un signal négatif ou significativement réduit avec au moins un marqueur de cellules plasmocytaires normales,
- 15
- d) l'analyse des résultats obtenus lors des étapes b) et c) et la quantification des cellules plasmocytaires normales et des cellules plasmocytaires tumorales.
- 20

Préférentiellement, le marqueur de cellules plasmocytaires selon l'invention est un marqueur d'antigène de cellules plasmocytaires, préférentiellement un marqueur de cluster de différenciation (CD) de cellules plasmocytaires.

25 Par « marqueur » on entend toute(s) molécule(s) permettant la reconnaissance de la cible et sa détection par l'émission d'un signal détectable. Avantagusement, pour un marquage de séquence peptidique, les marqueurs selon l'invention sont des aptamers ou des anticorps conjugués à des fluorochromes, préférentiellement les fluorochromes sont sélectionnés parmi PE-Cy5.5, PE-CF594,

30 PE-Cy7, PE, APC et FITC. Alternativement, pour un marquage de l'ADN, les marqueurs selon l'invention peuvent également être des analogues de base, des molécules autofluorescentes lorsqu'elles se lient ou s'intercalent à l'ADN (par exemple le DAPI ; fluorescence bleue à environ 456nm) ou des molécules conjuguées

à des fluorochromes (par exemple des anticorps) pouvant se lier ou s'insérer à l'ADN.

Ainsi, la quantité de signal émis par un marqueur selon l'invention est liée à la quantité de complexes marqueur/cible, et donc au niveau d'expression de séquences peptidiques et/ou à la quantité d'ADN cible.

Par « signal », on entend tout signal émis avec des propriétés qui permettent de recouvrer ce signal après transmission. Ces propriétés peuvent par exemple être des fréquences, des modulations, des encodages. Préférentiellement, les signaux détectables sont émis dans des bandes de fréquences qui leur sont allouées, plus préférentiellement des couleurs du spectre visible dans une transmission optique. Aussi, différents marqueurs qui émettent différents signaux détectables dans des bandes de fréquences proches peuvent être détectés par un même détecteur, ou différents marqueurs qui émettent un même signal détectable unique peuvent être détectés par un même détecteur.

Par « détecteur » on entend tout système/dispositif permettant de recouvrer un des signaux détectables parmi les autres, sa détection et/ou sa quantification. Préférentiellement, le détecteur utilise un filtre pour isoler le signal qu'il détecte. Plus préférentiellement, ce filtre est de type passe-bande. Préférentiellement, la détection et/ou la quantification est réalisée par un convertisseur photonique/électronique, par exemple des photodiodes, photodiodes à avalanche, photomultiplicateurs (PMT).

Par « plasmocyte normal » on entend des plasmocytes, cellules plasmiques ou plasmocytes présentant les antigènes (Cluster de différenciation ; CD) sélectionnés parmi, CD19, CD27, CD38, CD45, CD81, CD5L, CD11a, CD16b, CD24, CD36, CD52, CD68, CD79a, CD80, CD82, CD84, CD99, CD138, CD163, et ne présentant pas les antigènes CD20, CD28, CD52, CD56, CD117 et CD200. Les plasmocytes normaux présentent les chaînes intra cytoplasmiques kappa ou lambda avec des proportions respectives de 2/3 et 1/3.

Par « plasmocyte tumoral » on entend des plasmocytes, cellules plasmiques ou plasmocytes présentant au moins une altération par rapport au profil normal :

- perte d'au moins un CD parmi CD19, CD27, CD45, CD52 et CD81,
- gain d'au moins un CD parmi CD20, CD28, CD56, CD117, CD200 et CD229,
- changement du niveau d'expression d'au moins un CD parmi CD5L, CD11a, CD16b, CD24, CD36, CD52, CD68, CD79a, CD80, CD82, CD84, CD99, CD138 et

CD163, sous-exprimés dans les plasmocytes tumoraux, CD1D, CD2BP2, CD32c, CD47, CD59, CD109, CD138, CD300a et CD320, surexprimés dans les plasmocytes tumoraux et/ou

– altération du ratio kappa/lambda (monoclonalité).

5 L'expression « signal positif » signifie selon l'invention que le signal est dit positif lorsque les marqueurs spécifiques de cellules plasmocytaires utilisés se lient à leurs cibles et émettent un signal significativement détectable. Le « signal positif » montre ainsi que la ou les cellule(s) plasmocytaire(s) détectée(s) à l'étape b) du procédé selon l'invention présente(nt) un niveau d'expression significativement
10 augmenté de la molécule reconnue par le(s) marqueur(s) utilisé(s) par la ou les cellule(s) plasmocytaire(s) détectée(s).

Par « signal négatif » on entend que le signal est dit négatif lorsque les marqueurs spécifiques de cellules plasmocytaires utilisés ne se lient pas, ou se lient faiblement, à leurs cibles et n'émettent donc pas de signal significativement
15 détectable. Le « signal négatif » de ces marqueurs spécifiques montre ainsi que la ou les cellule(s) plasmocytaire(s) détectée(s) à l'étape b) du procédé selon l'invention présente un niveau d'expression négatif ou significativement réduit de la molécule reconnue par le(s) marqueur(s) utilisé(s).

Préférentiellement, l'échantillon de cellules utilisé pour le procédé selon
20 l'invention est choisi parmi, ou obtenu à partir de la moelle osseuse, du sang, du sérum, d'un extrait sanguin, des PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*), du liquide céphalorachidien, du liquide pleural et des ganglions lymphatiques, préférentiellement de la moelle osseuse d'un patient.

Selon un mode de réalisation particulier, l'échantillon de cellules du procédé
25 selon l'invention provient d'un patient atteint de gammopathie monoclonale, ou d'une personne susceptible d'être atteinte d'une gammopathie monoclonale.

Selon un mode de réalisation préféré, les CD spécifiques de cellules plasmocytaires normales du procédé selon l'invention sont choisis parmi : CD19, CD27, CD45, CD81, CD5L, CD11a, CD16b, CD24, CD36, CD52, CD68, CD79a, CD80,
30 CD82, CD84, CD99 et CD163, préférentiellement CD19, CD27, CD45 et CD81 plus préférentiellement CD19, CD27.

Selon un mode de réalisation préféré, les CD spécifiques de cellules plasmocytaires tumorales du procédé selon l'invention sont choisis parmi : CD56, CD117, CD200, CD20, CD28, CD1D, CD2BP2, CD32c, CD47, CD59, CD109, CD229,

CD300a et CD320, préférentiellement CD56, CD117, CD200, CD20, et CD28, plus préférentiellement CD56, CD117, CD200.

Préférentiellement, le procédé selon l'invention comprend en outre l'analyse des signaux du FSC (« Forward Scatter ») et du SSC (« Side Scatter »). FSC et SSC correspondent à des mesures simultanées réalisées par cytométrie de flux permettant de déterminer les caractéristiques physiques et biologiques de cellules isolées. Par définition, le FSC correspond à l'intensité de la lumière diffractée de la source d'excitation dans l'axe (angle <math><12^\circ</math>), qui est proportionnelle à la taille de la cellule, tandis que le SSC correspond à l'intensité de la lumière diffractée orthogonalement, dit « aux grands angles » (proche de 90°), par rapport à la source lumineuse incidente qui est représentative de la complexité intracellulaire.

Selon un mode de réalisation préféré, l'échantillon du procédé selon l'invention est mis en contact avec :

- un marqueur de la chaîne κ , un marqueur de la chaîne λ et un marqueur de CD38 ou CD138, préférentiellement CD38, chacun des trois marqueurs émettant un signal différent,
- un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs de CD de cellules plasmocytaires normales sélectionné(s) parmi les marqueurs de CD19, CD27, CD45, CD81, CD5L, CD11a, CD16b, CD24, CD36, CD52, CD68, CD79a, CD80, CD82, CD84, CD99 et CD163, préférentiellement les marqueurs de CD19, CD27, CD45 et CD81, plus préférentiellement un marqueur de CD19 et un marqueur de CD27, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des trois premiers signaux, et
- un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs, plus préférentiellement au moins trois marqueurs de CD de cellules plasmocytaires tumorales sélectionné(s) parmi les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD28, CD1D, CD2BP2, CD32c, CD47, CD59, CD109, CD229, CD300a et CD320, préférentiellement les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, et CD28, plus préférentiellement un marqueur de CD56, un marqueur de CD117 et un marqueur de CD200, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des quatre premiers signaux.

Préférentiellement, l'échantillon du procédé selon l'invention est mis en contact avec :

- un marqueur de la chaîne κ , un marqueur de la chaîne λ et un marqueur de CD38, chacun des trois marqueurs émettant un signal différent,
- un marqueur de CD19 et un marqueur de CD27, émettant un signal différent desdits trois premiers signaux, et
- 5 - un marqueur de CD56, un marqueur de CD117 et un marqueur de CD200, émettant un signal différent des quatre premiers signaux.

Préférentiellement, le marqueur CD38 ou CD138 est respectivement un anticorps anti-CD38 ou anti-CD138 conjugué au fluorochrome PE-Cy5.5, le marqueur de la chaîne κ est un anticorps anti-chaîne κ conjugué au fluorochrome PE-CF594 et le

10 marqueur de la chaîne λ est un anticorps anti-chaîne λ conjugué au fluorochrome FITC ; la détection se faisant sur les détecteurs du cytomètre en flux appropriés selon l'état de l'art.

Avantageusement, les marqueurs CD19 et CD27 sont des anticorps anti-CD19 et anti-CD27 conjugués aux fluorochrome PE-Cy7, et les marqueurs CD56, CD117 et CD200 sont des anticorps anti-CD56, anti-CD117 et anti-CD200 conjugués au fluorochrome PE ; la détection se faisant sur les détecteurs du cytomètre en flux appropriés selon l'état de l'art.

15

De plus, comme indiqué précédemment, l'index de prolifération des plasmocytes tumoraux correspond au pourcentage de cellules tumorales en phase S, calculé en cytométrie de flux, est un puissant facteur pronostique, permettant d'évaluer la vitesse de développement de la masse tumorale et de déterminer si un patient est en rechute active ou non.

20

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention comprend en outre la détermination de l'index de prolifération des plasmocytes tumoraux comprenant les étapes suivantes:

25

- A. mise en contact dudit échantillon de cellules avec un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement deux marqueurs, de prolifération cellulaire, émettant un signal différent des autres marqueurs utilisés;
- 30 B. détection des plasmocytes tumoraux en prolifération par analyse du signal émis par ledit ou lesdits marqueur(s) ;
- C. détermination du pourcentage de cellules tumorales et de plasmocytes normaux étant en phase S ;

D. optionnellement détermination de la diploïdie (G0/G1 ou G2/M) lorsque au moins un du ou desdits marqueur(s) de prolifération cellulaire est un marqueur de l'ADN.

- 5 On entend par « marqueurs de prolifération » tous marqueurs permettant de déterminer si une cellule est en phase du cycle cellulaire G0/G1, G2/M ou S. Les marqueurs de prolifération sont par exemple choisis parmi :
- des marqueurs de prolifération permettant d'identifier les cellules en phase S, tel que les analogues de bases de type BrdU ou EdU,
 - 10 – des marqueurs de prolifération permettant d'identifier les cellules en phases G0 (cellules quiescentes) ou G1/S/G2/M (cellules non quiescentes), par exemple des marqueurs de protéines tel que Ki67 (Dako)
 - des marqueurs de prolifération permettant d'identifier les cellules en phases G0/G1 ou G2/M, par exemple des marqueurs d'acides désoxyribonucléiques
 - 15 (ADN), tel que l'acridine orange, DAPI, Iodure de Propidium (PI), colorant Hoeschst (33342 ou 33258);

Selon un mode de réalisation particulier, les marqueurs de la prolifération des plasmocytes tumoraux du procédé selon l'invention sont sélectionnés parmi :

- 20 – des analogues de bases de type BrdU reconnu par un anticorps anti-BrdU conjugué à l'allophycocyanine (APC) ou Ethynyl-désoxyuridine (EdU) reconnu par un azoture couplé à un fluorochrome, préférentiellement l'Alexa Fluor® 647 ; et/ou
- des protéines qui sont présentes en cycle cellulaire actif, par exemple Ki67
- 25 reconnu par un anticorps anti-Ki67 conjugué à un fluorochrome, préférentiellement l'Alexa Fluor 647 ; et/ou
- des marqueurs d'acides désoxyribonucléiques (ADN), tel que le DAPI, PI, colorant Hoeschst (33342 ou 333258), etc...

- 30 Le terme « BrdU » (BrdU FlowKit ; BD Pharmingen) est défini comme un nucléoside synthétique, analogue structurel de la thymidine, qui peut être incorporé dans l'ADN et qui peut être détecté par un anticorps spécifique pour déterminer la phase du cycle cellulaire d'une cellule et notamment si cette dernière est en phase de réplication de l'ADN (phase S). Le terme « EdU » (Click-iT® EdU ; Thermofisher)

est défini comme un nucléoside synthétique (analogue structurel de la thymidine) qui est incorporé à l'ADN lors de sa réplication. La liaison entre un alcyne du fragment éthyne de l'EdU et un azoture couplé à un fluorochrome est réalisée par réaction de cycloaddition, une des réactions de ligation les plus populaires de la « click-chemistry ». L'EdU peut alors être détectée lors de son incorporation à l'ADN afin de déterminer si les cellules d'intérêt sont en phase de réplication de l'ADN (phase S).

Avantageusement, le procédé de détermination de l'index de prolifération des plasmocytes tumoraux selon l'invention comprend les étapes suivantes:

- 10 A1. mise en contact du BromodesoxyUridine (BrdU) avec un échantillon de cellules (suivant les recommandations du fournisseur ; BrdU FlowKit ; BD Pharmingen ; Cat. : 557892) ;
- B1. dénaturation de l'ADN par l'action d'une désoxyribonucléase (DNase, BrdU FlowKit ; BD Pharmingen ; Cat. : 557892) ;
- 15 C1. marquage du BrdU incorporé à l'ADN par un anticorps anti-BrdU conjugué à un fluorochrome émettant un signal différent du signal des autres marqueurs utilisés, préférentiellement ledit fluorochrome est l'APC ;
- D1. détection en cytométrie en flux desdites cellules marquées par ledit BrdU ;
- E1. détermination du pourcentage de cellules tumorales et de plasmocytes normaux en phase S.
- 20

Préférentiellement, le procédé de détermination de l'index de prolifération des plasmocytes tumoraux selon l'invention comprend les étapes suivantes:

- 25 A2. mise en contact d'Ethyndésoxyuridine (EdU) avec un échantillon de cellules (suivant les recommandations du fournisseur ; Click-it® Plus EdU Alexa Fluor® 647 Flow Cytometry Assay Kit, Life Technologies, Cat. : C10635) ;
- B2. marquage de l'EdU avec un fluorochrome émettant un signal différent du signal des autres marqueurs utilisés, préférentiellement ledit fluorochrome est l'Alexa Fluor® 647 ;
- 30 C2. détection en cytométrie en flux desdites cellules marquées par ledit EdU ;
- D2. détermination du pourcentage de cellules tumorales et de plasmocytes normaux en phase S.

Préférentiellement, le procédé de détermination de l'index de prolifération des plasmocytes tumoraux selon l'invention comprend en outre une étape

35

additionnelle d'évaluation de la diploïdie consistant à ajouter entre les étapes C1 et D1 ou B2 et C2 du DAPI.

5 Préférentiellement, le procédé de détermination de l'index de prolifération des plasmocytes tumoraux selon l'invention comprend les étapes suivantes:

- A3. mise en contact du BromodesoxyUrydine (BrdU) avec un échantillon de cellules (suivant les recommandations du fournisseur ; BrdU FlowKit ; BD Pharmingen ; Cat. : 557892) ;
- 10 B3. dénaturation de l'ADN par l'action d'une désoxyribonucléase (DNase, BrdU FlowKit ; BD Pharmingen ; Cat. : 557892) ;
- C3. marquage du BrdU incorporé à l'ADN par la fixation d'un anticorps anti-BrdU conjugué à un fluorochrome émettant un signal différent des signaux des autres marqueurs utilisés, préférentiellement ledit fluorochrome est l'APC ;
- D3. mise en contact du DAPI avec l'échantillon de cellules ;
- 15 E3. détection en cytométrie en flux desdites cellules marquées par lesdits BrdU et DAPI;
- F3. détermination de la diploïdie et du pourcentage de cellules tumorales et de plasmocytes normaux étant en phase S.

20 Préférentiellement, le procédé de détermination de l'index de prolifération des plasmocytes tumoraux selon l'invention comprend les étapes suivantes:

- A4. mise en contact d'Ethynyldeoxyuridine (EdU) avec un échantillon de cellules (suivant les recommandations du fournisseur ; Click-it® Plus EdU Alexa Fluor® 647 Flow Cytometry Assay Kit, Life Technologies, Cat. : C10635) ;
- 25 B4. marquage de l'EdU avec un fluorochrome émettant un signal différent du signal des signaux des autres marqueurs utilisés, préférentiellement ledit fluorochrome est l'Alexa Fluor® 647 ;
- C4. mise en contact du DAPI avec l'échantillon de cellules ;
- D4. détection en cytométrie en flux desdites cellules marquées par lesdits EdU et DAPI;
- 30 E4. détermination de la diploïdie des cellules tumorales et des plasmocytes normaux.

La proportion de plasmocytes tumoraux par rapport aux autres leucocytes donne une image de l'environnement cellulaire, mais cette proportion est influencée par les variations des autres populations leucocytaires.

La quantification des cellules tumorales donne quant à elle une évaluation de la masse tumorale. Cette quantification peut être réalisée par l'analyse d'un volume connu en cytométrie de flux, par l'utilisation de particules de comptage, tel que des billes de polystyrène fluorescentes (par exemple commercialisées par Coulter, FlowCyto Standard Corporation, Polysciences, Sperotech, BD TrueCounts, DakoCytomation...), introduites en quantité connue dans un volume d'échantillon connu, ou encore indirectement par la proportion de plasmocytes tumoraux par rapport à une population quantifiée par ailleurs (par exemple le nombre de leucocytes totaux de l'échantillon, issu d'un automate de numération).

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, le procédé de détection par cytométrie en flux de la présence de cellules plasmocytaires normales et de cellules plasmocytaires tumorales dans un échantillon de cellules d'un patient selon l'invention comprend en outre :

- une étape de détermination ou de réception de la quantité d'une population ou un groupe de populations cellulaires par unité de volume ;
- la détermination de la proportion des populations plasmocytaires par rapport à la population ou groupe de populations quantifiée(s) ;
- quantification des populations plasmocytaires par unité de volume ;

Par « réception de la quantité d'une population » on entend une action permettant de renseigner le système sur la quantité de cellules présentes dans l'échantillon à analyser ou déjà analysé (ex : quantification des leucocytes). Cette action peut par exemple consister en une transmission informatique, ou une saisie de l'opérateur.

Selon un mode de réalisation particulier, ledit patient est considéré à risque de développer une gammopathie monoclonale lorsque le nombre de cellules plasmocytaires tumorales par unité de volume est supérieur à une valeur seuil prédéfinie. Cette « valeur seuil prédéfinie » est déterminée à partir de résultats obtenus par le procédé selon l'invention à partir de sujets contrôle sains et/ou malades. Selon un mode particulier de réalisation de la présente invention, les valeurs seuils prédéfinies selon l'invention sont paramétrables.

La présente invention a également pour objet un procédé de diagnostic ou d'aide au diagnostic *in vitro* ou de suivi de gammopathie monoclonale, à partir d'un échantillon de cellules d'un patient comprenant les étapes suivantes :

- 1) mise en œuvre du procédé selon l'invention, et
- 5 2) mise en évidence d'un risque de développer une gammopathie monoclonale :
 - a) si la proportion de cellules plasmocytaires tumorales parmi les cellules leucocytaires totales, d'après les résultats de l'analyse de l'étape d) du procédé selon l'invention, dépasse un seuil prédéfini; et/ou
 - b) si le nombre de plasmocytes tumoraux par unité de volume dépasse un
 - 10 seuil prédéfini.

La présente invention a également pour objet un procédé de diagnostic ou d'aide au diagnostic *in vitro* de gammopathie monoclonale à partir d'un échantillon de cellules d'un patient dans lequel les étapes 1) et 2) selon l'invention sont

15 automatisées.

La présente invention a également pour objet un procédé de suivi *in vitro* de l'évolution de la maladie d'un patient atteint d'une gammopathie monoclonale à partir d'un premier et d'un second échantillon de cellules du patient, comprenant les

20 étapes suivantes :

- i) la mise en œuvre du procédé de détection selon l'invention dans un premier échantillon de cellules du patient
- ii) la mise en œuvre du procédé de détection selon l'invention dans un second échantillon de cellules du patient, ledit second échantillon ayant été prélevé
- 25 après le prélèvement dudit premier échantillon, et
- iii) la comparaison de l'analyse des résultats de l'étape d) obtenus avec le premier et le second échantillon, et
- iv) le suivi de l'évolution de ladite gammopathie monoclonale (masse tumorale, prolifération, monoclonalité...) dudit patient d'après les résultats de l'analyse de
- 30 l'étape iii).

La présente invention a également pour objet un procédé de suivi *in vitro* de l'évolution de la maladie d'un patient atteint d'une gammopathie monoclonale, à partir d'un premier et d'un second échantillon de cellules du patient, caractérisé en

35 ce que les étapes i), ii), iii) et iv) sont automatisées.

La présente invention concerne également une composition comprenant au moins :

- un marqueur de la chaîne κ et un marqueur de la chaîne λ , émettant un signal différent,
- 5 - un marqueur choisi parmi : un marqueur de CD38 ou un marqueur de CD138, ledit marqueur émettant un signal différent des deux premiers signaux,
- un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs, de CD spécifiques de cellules plasmocytaires normales sélectionnés parmi les marqueurs de CD19, CD27, CD45, CD81, CD5L, CD11a, CD16b, CD24, CD36,
- 10 CD52, CD68, CD79a, CD80, CD82, CD84, CD99 et CD163, préférentiellement les marqueurs de CD19, CD27, CD45 et CD81, plus préférentiellement un marqueur de CD19 et un marqueur de CD27, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des trois premiers signaux, et
- un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs,
- 15 plus préférentiellement au moins trois marqueurs de CD spécifiques de cellules plasmocytaires tumorales sélectionnés parmi les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD52, CD28, CD1D, CD2BP2, CD32c, CD47, CD59, CD109, CD229, CD300a et CD320, préférentiellement les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD52 et CD28, plus préférentiellement un marqueur de CD56,
- 20 un marqueur de CD117 et un marqueur de CD200, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des quatre premiers signaux.

Avantageusement, la composition selon l'invention comprend au moins :

- 25 - un marqueur de la chaîne κ et un marqueur de la chaîne λ , émettant un signal différent ;
- un marqueur choisi parmi : un marqueur de CD38 et un marqueur de CD138, ledit marqueur émettant un signal différent des deux premiers signaux ;
- 30 - un marqueur de CD19 et un marqueur de CD27, lesdits marqueurs émettant un signal différent des trois premiers signaux ;
- un marqueur de CD56, un marqueur de CD117, un marqueur de CD200, lesdits marqueurs émettant un signal différent des quatre premiers signaux.

Selon un mode de réalisation avantageux, la composition selon l'invention comprend en outre un ou plusieurs marqueur(s) de la prolifération de plasmocytes tumoraux selon l'invention, émettant un signal différent de chacun des signaux des autres marqueurs présents dans ladite composition.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une composition comprenant au moins :

- un marqueur de la chaîne κ et un marqueur de la chaîne λ émettant un signal différent,
 - un marqueur choisi parmi : un marqueur de CD38 et un marqueur de CD138, ledit marqueur émettant un signal différent des deux premiers signaux,
 - un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs de CD de cellules plasmocytaires normales sélectionnés parmi les marqueurs de CD19, CD27, CD45, CD81, CD5L, CD11a, CD16b, CD24, CD36, CD52, CD68, CD79a, CD80, CD82, CD84, CD99 et CD163, préférentiellement les marqueurs de CD19, CD27, CD45 et CD81, plus préférentiellement un marqueur de CD19 et un marqueur de CD27, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des trois premiers signaux, et
 - un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs, plus préférentiellement au moins trois marqueurs de CD de cellules plasmocytaires tumorales sélectionnés parmi les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD52, CD28, CD1D, CD2BP2, CD32c, CD47, CD59, CD109, CD229, CD300a et CD320, préférentiellement les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD52 et CD28, plus préférentiellement un marqueur de CD56, un marqueur de CD117 et un marqueur de CD200, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des quatre premiers signaux,
- pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention.

Avantageusement, la présente invention a pour objet l'utilisation d'une composition comprenant au moins :

- un marqueur de la chaîne κ et un marqueur de la chaîne λ , émettant un signal différent ;
- un marqueur choisi parmi : un marqueur de CD38 et un marqueur de CD138, ledit marqueur émettant un signal différent des deux premiers signaux ;

- un marqueur de CD19 et un marqueur de CD27, lesdits marqueurs émettant un signal différent des trois premiers signaux ;
 - un marqueur de CD56, un marqueur de CD117, un marqueur de CD200, lesdits marqueurs émettant un signal différent des quatre premiers signaux ;
- 5 pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention.

Selon un mode de réalisation particulier, l'utilisation d'une composition selon l'invention comprend en outre un ou plusieurs marqueurs de la prolifération de plasmocytes tumoraux selon l'invention émettant un signal différent des signaux de
10 chacun des autres marqueurs présents dans ladite composition.

La présente invention a également pour objet un kit pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention, comprenant au moins :

- un marqueur de la chaîne κ , et un marqueur de la chaîne λ , émettant un signal différent,
- 15 - un marqueur de CD38 ou un marqueur de CD138 émettant un signal différent des deux premiers signaux;
- un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs de CD de cellules plasmocytaires normales sélectionnés parmi les marqueurs de CD19, CD27, CD45, CD81, CD5L, CD11a, CD16b, CD24, CD36, CD52, CD68, CD79a, CD80,
20 CD82, CD84, CD99 et CD163, préférentiellement les marqueurs de CD19, CD27, CD45 et CD81, plus préférentiellement un marqueur de CD19 et un marqueur de CD27, chacun de ces un ou plusieurs marqueurs émettant un signal différent des trois premiers signaux ; et
- un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs, plus
25 préférentiellement au moins trois marqueurs de CD de cellules plasmocytaires tumorales sélectionnés parmi les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD52, CD28, CD1D, CD2BP2, CD32c, CD47, CD59, CD109, CD229, CD300a et CD320, préférentiellement les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD52 et CD28, plus préférentiellement un marqueur de CD56, un marqueur de CD117 et
30 un marqueur de CD200, chacun de ces un ou plusieurs marqueurs émettant un signal différent des quatre premiers signaux.

Selon un mode de réalisation préféré, le kit pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention, comprend au moins :

- un marqueur de la chaîne κ et un marqueur de la chaîne λ , émettant un signal différent ;
- un marqueur de CD38 ou un marqueur de CD138, émettant un signal différent des deux premiers signaux ;
- 5 - un marqueur de CD19 et un marqueur de CD27, émettant un signal différent du des trois premiers signaux;
- un marqueur de CD56, un marqueur de CD117 et un marqueur de CD200, émettant un signal différent des quatre premiers signaux.

10 Selon un mode de réalisation particulier, le kit selon l'invention comprend en outre un ou plusieurs marqueurs de la prolifération de plasmocytes tumoraux selon l'invention émettant un signal différent de chacun des autres marqueurs présents dans ledit kit.

15 Avantageusement, le kit selon l'invention comprend également au moins un marqueur de prolifération cellulaire choisi parmi:

- des analogues de bases de type BrdU et un anticorps anti-BrdU conjugué à l'APC ou EdU et un azoture couplé à un fluorochrome, préférentiellement l'Alexa Fluor® 647; et/ou
- 20 - des marqueurs de protéines qui sont présentes en cycle cellulaire actif, par exemple Ki67 reconnu par un anticorps anti-Ki67 conjugué à un fluorochrome, préférentiellement l'Alexa Fluor 647 ; et/ou
- des marqueurs d'acides désoxyribonucléiques (ADN), tel que le DAPI, PI, colorant Hoeschst (33342 ou 33258), etc...

25 chacun du ou desdits marqueur(s) de prolifération cellulaire émettant un signal différent des signaux émis par les autres marqueurs présents dans ledit kit, en particulier différent des cinq premiers signaux.

30 Selon un mode de réalisation préférentiel, le kit selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend au moins un marqueur de prolifération cellulaire choisi parmi:

- un analogue de bases BromodesoxyUrydine (BrdU) ;
- une désoxyribonucléase (DNase, BrdU FlowKit ; BD Pharmingen ; Cat.: 557892) ;

- un marqueur comprenant un anticorps anti-BrdU conjugué à un fluorochrome, émettant un signal différent de chacun des autres signaux émis par les marqueurs présents dans ledit kit ;
- optionnellement du DAPI émettant un signal différent des signaux de chacun

5 des autres marqueurs présents dans ledit kit ;
chacun du ou desdits marqueur(s) de prolifération cellulaire émettant un signal différent du signal de chacun des marqueurs présents dans ledit kit.

Selon un mode de réalisation préférentiel, le kit selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend au moins un marqueur de prolifération cellulaire

10 choisi parmi:

- un analogue de bases Ethynyl-désoxyuridine (EdU) ;
- un azoture couplé à un fluorochrome, émettant un signal différent de chacun des autres signaux émis par les marqueurs présents dans ledit kit;
- optionnellement du DAPI émettant un signal différent des signaux de chacun

15 des marqueurs présents dans ledit kit.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les exemples et figures suivants :

20

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1: Discrimination des plasmocytes tumoraux par fenêtrages successifs.

Figure 2 : Représentation de la discrimination des plasmocytes tumoraux par les

25 fenêtrages successifs selon la méthode STI.

Figure 3 : Suivi de la prolifération des plasmocytes normaux et tumoraux par l'utilisation de BrdU et DAPI ou de Ki67 et DAPI à partir d'un échantillon de patient atteint de myélome multiple avec un taux normal de plasmocytes en phase S.

Figure 4 : Suivi de la prolifération des plasmocytes normaux et tumoraux par

30 l'utilisation de BrdU et DAPI ou de Ki67 et DAPI à partir d'un échantillon de patient atteint de myélome multiple avec un fort taux de plasmocytes en phase S.

Figure 5 : Détermination du pourcentage de cellules tumorales en phase S par l'utilisation de DAPI et d'EdU.

35 **EXEMPLES**

Exemple 1 : Détection des cellules plasmocytaires tumorales et normales chez un patient atteint de MM

Cette stratégie a pour principe la discrimination des cellules d'intérêt grâce à leur
 5 taille, leur complexité structurale et la présence des marqueurs cellulaires, ou
 antigènes, reconnus par des anticorps couplés à des fluorochromes. Elle compte 8
 antigènes caractéristiques des cellules plasmocytaires (CD38, κ , λ , CD19, CD27, CD56,
 CD117 et CD200) dont les anticorps spécifiques sont couplés à 5 fluorochromes
 différents dans un unique tube (CD38/PeCy5.5, κ /PECF594, λ /FITC, (CD19,
 10 CD27)/PeCy7, (CD56, CD117, CD200)/PE). Cette stratégie peut être réalisée en une
 demi-journée.

Les anticorps anti-CD38, anti-kappa et anti-lambda sont utilisés pour discriminer les
 plasmocytes totaux des autres leucocytes et deux groupes d'anticorps permettent
 l'identification des cellules tumorales. Le groupe négatif contient les anticorps anti-
 15 CD19 et anti-CD27 et le groupe positif contient les anticorps anti-CD56, anti-CD117 et
 anti-CD200. La Figure 1 représente les différents fenêtrages réalisés pour identifier
 les plasmocytes. La première étape consiste à éliminer les multiplets grâce à
 l'analyse de forme des impulsions sur les canaux FSC et SSC. Puis, les débris sont
 éliminés sur la matrice FSC/SSC. Les cellules qui expriment fortement soit CD38 et κ ,
 20 soit CD38 et λ sont alors sélectionnées sur les matrices CD38/ κ ou
 CD38/ λ respectivement. Les événements sur la diagonale de la matrice κ / λ sont
 éliminés. Après avoir discriminé la population de plasmocytes, les cellules tumorales
 sont identifiées grâce aux groupes positif et négatif.

25 Préparation de l'échantillon

Suite au prélèvement de la moelle osseuse, cette dernière doit être filtrée afin
 d'éliminer les éventuels débris d'os. Les globules rouges sont ensuite lysés avec une
 lyse NH_4Cl (ratio $\frac{1}{4}$) et leurs débris sont en grande partie éliminés par centrifugation.
 Les anticorps membranaires couplés à leur fluorochrome respectif CD56-PE (Beckman
 30 Coulter ; Cat. : A07788), CD117-PE (Beckman Coulter ; Cat. : IM2732), CD200-PE (BD
 Pharmingen ; Cat. : 552475) (groupe positif), CD19-PeCy7 (Beckman Coulter ; Cat. :
 IM3628), CD27-PeCy7 (Beckman Coulter ; Cat. : A54823) (groupe négatif), CD38-
 PeCy5.5 (Beckman Coulter ; Cat. : A70205) sont déposés directement dans la
 préparation cellulaire selon les recommandations du fabricant. Après une incubation

de 20 minutes à 4°C et un lavage au PBS, les cellules sont fixées (kit Intraprep ; Beckman Coulter ; Cat. : A07803). Ces dernières sont ensuite lavées avec du PBS pour éliminer la totalité de la solution de fixation. Les cellules sont enfin perméabilisées (kit Intraprep ; Beckman Coulter ; Cat. : A07803) et marquées avec les couples anticorps intracytoplasmiques/fluorochromes κ -PE-CF594 (BD Pharmingen ; Cat. : 562620) et λ -FITC (BD Pharmingen ; Cat. : 555796) selon les recommandations du fabricant. Après incubation de 20 minutes à 4°C et lavage au PBS, l'échantillon est analysé grâce au dispositif de cytométrie en flux (BD LSRFORTESSA X-20, BD Biosciences).

10

Analyse

Elimination des multiplets

Dans un premier temps, les cellules qui passent au même instant dans la fenêtre de mesure sont éliminées en utilisant les paramètres FSC et SSC qui correspondent respectivement à la taille et à la complexité structurale de la cellule. Pour ces deux paramètres, la matrice de la hauteur et de l'aire du pic de mesure est utilisée et les événements sortant de la diagonale de cette matrice sont éliminés. En effet, les valeurs de la hauteur et de l'aire sont proportionnelles et l'absence de cette proportionnalité (points à l'extérieur de la diagonale) traduit la présence de doublets voire multiplets.

20

Elimination des débris

On élimine ensuite les débris cellulaires dus à la lyse, principalement les débris de globules rouges. La matrice FSC/SSC est utilisée pour sélectionner l'ensemble des leucocytes et éliminer les débris cellulaires ayant une petite taille et une structure peu complexe.

25

Sélection des plasmocytes totaux

La sélection des plasmocytes totaux est réalisée grâce à trois marqueurs, permettant de détecter le CD38 et les deux protéines intracytoplasmiques κ et λ . Les plasmocytes sont des cellules exprimant fortement sur la surface de leur membrane le marqueur CD38. Ces cellules sont capables de produire des anticorps composés de chaînes légères (κ ou λ) et de chaînes lourdes. Chaque plasmocyte ne peut produire qu'un seul type de chaînes légères et la proportion des plasmocytes dits « kappa » ou

30

« lambda » est de 2/3 et 1/3 respectivement. Chez les patients atteints de myélome multiple, la prolifération d'un clone κ ou λ va induire un déséquilibre du ratio κ/λ .

Les plasmocytes sont sélectionnés sur les matrices CD38/ κ et CD38/ λ indépendamment.

5

Elimination des événements κ/λ

Les événements se trouvant sur la diagonale des dimensions κ et λ sont éliminés. En effet, les plasmocytes peuvent sécréter soit la chaîne légère κ soit la chaîne légère λ tout au long de leur vie mais jamais les deux.

10

Discrimination plasmocytes tumoraux/normaux

Une fois la sélection des plasmocytes totaux réalisée, les plasmocytes tumoraux doivent être discriminés par rapport aux plasmocytes normaux en sélectionnant les cellules exprimant un marqueur du groupe positif (CD56/CD117/CD200) mesuré sur le canal du PE et/ou ayant une perte d'expression d'un des marqueurs du groupe négatif (CD19/CD27) mesurée sur le canal PE-Cy7.

15

Exemple 2 : Comparaison de la stratégie selon l'invention avec une stratégie connue de l'état de l'art

20 La stratégie développée et mise en œuvre par le laboratoire "Suivi des thérapie innovante" et décrite dans l'état de l'art (Caraux et al. ; 2012), que nous appellerons ici "stratégie STI", fait appel à 10 anticorps dirigés contre des antigènes caractéristiques des cellules plasmocytaires (CD38, CD45, CD19, CD20, κ , λ , CD27, CD56, CD117 et CD200) couplés à 7 fluorochromes différents répartis dans 4 tubes indépendants.

25

La Figure 2 représente les fenêtrages successifs de la stratégie STI. La première étape consiste à éliminer les multiplets (plusieurs cellules passant dans la fenêtre de détection en même temps) grâce aux dimensions FSC et SSC. Puis, les débris, de très petites tailles (FSC) et granulosités (SSC) sont éliminés sur la matrice FSC/SSC.

30

Toutes les cellules exprimant fortement CD38, telles que les plasmocytes, sont alors sélectionnées sur le cytogramme CD38/CD45. Les événements sur la diagonale du cytogramme κ/λ sont alors éliminés. En effet, les plasmocytes sécrètent soit la chaîne légère κ , soit la chaîne légère λ . Après avoir identifié la population de plasmocytes totaux dans chacun des 4 tubes, les cellules tumorales sont différenciées

des plasmocytes normaux grâce aux marqueurs permettant de détecter le CD27, le CD56, le CD117 et le CD200 par perte d'expression du premier et/ou expression des suivants.

5

Exemple 3. Détermination du pourcentage de cellules tumorales en phase S

L'analyse BrdU permet de déterminer le pourcentage de cellules tumorales en phase S (phase de Synthèse). Le DAPI (4',6'-diamidino-2-phényllindole, molécule
10 fluorescente capable de se lier fortement aux bases Adénine (A) et Thymidine (T) de l'ADN) est utilisé pour permettre de quantifier l'ADN (2N/4N).

Matériels et méthodes

Pour suivre la prolifération cellulaire, le kit APC BrdU Flow Kit a été utilisé selon les
15 recommandations du fournisseur (BD Pharmigen, Cat. : 557892).

A la suite du protocole décrit dans l'exemple 1, 350µL d'un mélange DAPI/PermWash à 2µL/mL ont été ajoutés à la solution cellulaire puis incubé 20 minutes à 4°C. La solution cellulaire est ensuite lavée avec du PBS puis reprise dans du PBS avant d'être analysée en cytométrie en flux (cytomètre CyAn™ ADP - Beckman Coulter).

20

Résultats

Patient atteint de myélome multiple avec un taux normal de plasmocytes en phase S (0,60%) (Figure 4).

Patient atteint de myélome multiple avec un fort taux de plasmocytes en phase S
25 (4,89%) (Figure 5).

Exemple 4. Détermination du pourcentage de cellules engagées dans le cycle cellulaire (non quiescentes)

Le Ki67 permet de quantifier le pourcentage de cellules engagées dans le cycle
30 cellulaire (non quiescentes). Le DAPI (4',6'-diamidino-2-phényllindole, molécule fluorescente capable de se lier fortement aux bases Adénine (A) et Thymidine (T) de l'ADN) est utilisé pour permettre de quantifier l'ADN (2N/4N).

Matériels et méthodes

Deux tubes sont utilisés, un contrôle négatif avec l'isotype APC (Beckman Coulter, Ref: IM2475U) ajouté à la solution cellulaire au moment du marquage des anticorps de surface et un tube Ki67 positif avec l'anti-Ki67 couplé à l'Alexa Fluor 647 (BD Pharmigen, Cat. : 558615) ajouté à la solution cellulaire au moment du marquage des anticorps intracytoplasmiques.

A la suite du précédent protocole, 350µL d'un mélange DAPI/PermWash à 2µL/mL ont été ajoutés à la solution cellulaire puis incubé 20 minutes à 4°C. La solution cellulaire est ensuite lavé avec du PBS puis reprise dans du PBS avant d'être analysée en cytométrie en flux (cytomètre CyAn™ ADP - Beckman Coulter).

10

Résultats

Patient atteint de myélome multiple avec un taux de cellules engagées dans le cycle cellulaire (non quiescentes) (21%) (Figure 4).

Patient atteint de myélome multiple avec un taux de cellules engagées dans le cycle cellulaire (non quiescentes) (39,5%) (Figure 5).

Exemple 5. Détermination du pourcentage de cellules tumorales en phase S par l'utilisation de DAPI et d'EdU

20 Matériels et méthodes

Pour suivre la prolifération cellulaire, le kit Click it® Plus EdU Alexa Fluor® 647 Flow Cytometry Assay Kit a été utilisé selon les recommandations du fournisseur (Life Technologies, Cat. : C10635).

A la suite du précédent protocole, 350µL d'un mélange DAPI/PermWash à 2µL/mL ont été ajoutés à la solution cellulaire puis incubé 20 minutes à 4°C. La solution cellulaire est ensuite lavé avec du PBS puis reprise dans du PBS avant d'être analysée en cytométrie en flux (cytomètre BD LSRFortessa™ X-20 - BD Biosciences).

Résultats

30 Le suivi de la prolifération des plasmocytes peut être réalisé en deux dimensions (DAPI vs EdU) ou en une dimension (histogramme EdU).

Les résultats présentés en figure 5 montrent qu'en utilisant une ou deux dimensions il est possible d'identifier respectivement 2,89% et 2,80% de plasmocytes en phase S en présence d'EdU (Tube positif) chez un patient diagnostiqué avec un myélome multiple.

35

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Caraux, A., Klein, B., Paiva, B., Bret, C., Schmitz, A., Fuhler, G.M., Bos, N.A., Johnsen, H.E., Orfao, A., Perez-Andres, M., et al. (2010). Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica* 95, 1016-1020.
- 5 Caraux, A., Vincent, L., Bouhya, S., Quittet, P., Moreaux, J., Requirand, G., Veyrune, J.-L., Olivier, G., Cartron, G., Rossi, J.-F., et al. (2012). Residual malignant and normal plasma cells shortly after high dose melphalan and stem cell transplantation. Highlight of a putative therapeutic window in Multiple Myeloma? *Oncotarget* 3, 1335-1347.
- 10 Martinez-Lopez, J., Lahuerta, J.J., Pepin, F., González, M., Barrio, S., Ayala, R., Puig, N., Montalban, M.A., Paiva, B., Weng, L., et al. (2014). Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 123, 3073-3079.
- 15 Mateo, G., Montalbán, M.A., Vidriales, M.-B., Lahuerta, J.J., Mateos, M.V., Gutiérrez, N., Rosiñol, L., Montejano, L., Bladé, J., Martínez, R., 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, 2737-2744.
- 20 Paiva, B., Vidriales, M.-B., Cerveró, J., Mateo, G., Pérez, J.J., Montalbán, M.A., Sureda, A., Montejano, L., Gutiérrez, N.C., Coca, A.G. de, 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, 4017-4023.
- 25 Paiva, B., Vidriales, M.-B., Montalbán, M.-Á., Pérez, J.J., Gutiérrez, N.C., Rosiñol, L., Martínez-López, J., Mateos, M.-V., Cordon, L., Oriol, A., et al. (2012). Multiparameter flow cytometry evaluation of plasma cell DNA content and proliferation in 595 transplant-eligible patients with myeloma included in the Spanish GEM2000 and GEM2005<65y trials. *Am. J. Pathol.* 181, 1870-1878.
- 30 Paiva, B., Chandia, M., Puig, N., Vidriales, M.-B., Perez, J.J., Lopez-Corral, L., Ocio, E.M., Garcia-Sanz, R., Gutierrez, N.C., Jimenez-Ubieto, A., et al. (2014). The prognostic value of multiparameter flow cytometry minimal residual disease assessment in relapse multiple myeloma. *Haematologica*.

- Rawstron, A.C., Child, J.A., de Tute, R.M., Davies, F.E., Gregory, W.M., Bell, S.E., Szubert, A.J., Navarro-Coy, N., Drayson, M.T., Feyler, S., et al. (2013). Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 2540-2547.

REVENDICATIONS

- 10 1. Procédé de détection par cytométrie en flux de la présence de cellules plasmocytaires normales et de cellules plasmocytaires tumorales dans un échantillon de cellules d'un patient, ledit procédé comprenant les étapes suivantes:
- a) la mise en contact dudit échantillon de cellules avec :
- un marqueur de la chaîne κ un marqueur de la chaîne λ , et un marqueur choisi parmi : un marqueur de CD38 et un marqueur de CD138, chacun des
 - 15 trois marqueurs émettant un signal différent,
 - un ou plusieurs marqueur(s) de cellules plasmocytaires tumorales, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent desdits trois premiers signaux,
 - 20 – un ou plusieurs marqueur(s) de CD de cellules plasmocytaires normales, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des quatre premiers signaux,
- b) la détection des cellules plasmocytaires caractérisées par :
- un signal positif avec un marqueur de CD38 ou un marqueur de CD138, et
 - 25 – un signal positif avec un marqueur de la chaîne κ ou un marqueur de la chaîne λ ,
- c) la détection des cellules plasmocytaires tumorales parmi les cellules plasmocytaires détectées à l'étape b) avec au moins un des critères suivants:
- signal positif avec au moins un marqueur spécifique de cellules
 - 30 plasmocytaires tumorales, et/ou
 - un signal négatif ou significativement réduit avec au moins un marqueur de cellules plasmocytaires normales,

d) l'analyse des résultats obtenus lors des étapes b) et c) et la détermination de la présence de cellules plasmocytaires normales et de cellules plasmocytaires tumorales.

- 5 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que :
- les CD spécifiques de cellules plasmocytaires normales du procédé selon l'invention sont choisis parmi : CD19, CD27, CD45, CD81, CD5L, CD11a, CD16b, CD24, CD36, CD52, CD68, CD79a, CD80, CD82, CD84, CD99 et CD163, préférentiellement CD19, CD27, CD45 et CD81 plus préférentiellement CD19, 10 CD27, et
 - les CD spécifiques de cellules plasmocytaires tumorales du procédé selon l'invention sont choisis parmi : CD56, CD117, CD200, CD20, CD28, CD1D, CD2BP2, CD32c, CD47, CD59, CD109, CD229, CD300a et CD320, préférentiellement CD56, CD117, CD200, CD20, et CD28, plus 15 préférentiellement CD56, CD117, CD200.
3. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédente, dans lequel le marqueur CD38 ou CD138 est respectivement un anticorps anti-CD38 ou anti-CD138 conjugué au fluorochrome PE-Cy5.5, le marqueur de la chaîne κ est l'anticorps anti-chaîne κ conjugué au fluorochrome PE-CF594 et le marqueur de la chaîne λ est un anticorps anti-chaîne λ conjugué au fluorochrome FITC. 20
4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les marqueurs CD19 et CD27 sont des anticorps anti-CD19 et anti-CD27 conjugués au fluorochromes PE-Cy7, 25 et les marqueurs CD56, CD117 et CD200 sont des anticorps anti-CD56, anti-CD117 et anti-CD200 conjugués aux fluorochrome PE.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comprenant en outre la détermination de l'index de prolifération des plasmocytes tumoraux 30 comprenant les étapes suivantes :
- A. mise en contact dudit échantillon de cellules avec un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement deux marqueurs, de prolifération cellulaire, émettant un signal différent des autres marqueurs utilisés;

- B. détection des plasmocytes tumoraux en prolifération par analyse du signal émis par ledit ou lesdits marqueur(s);
- C. détermination du pourcentage de cellules tumorales et de plasmocytes normaux étant en phase S ;
- 5 D. optionnellement détermination de la diploïdie (G0/G1 ou G2/M) lorsque au moins un du ou desdits marqueur(s) de prolifération cellulaire est un marqueur de l'ADN.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel l'échantillon de cellules est choisi parmi, ou obtenu à partir de la moelle osseuse, du sang, du sérum, d'un extrait sanguin, des PBMCs, du liquide céphalorachidien, du
10 liquide pleural et des ganglions lymphatiques, et préférentiellement de la moelle osseuse d'un patient.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel ledit
15 patient est atteint de gammopathie monoclonale.
8. Procédé de diagnostic *in vitro* ou de suivi de gammopathie monoclonale, à partir d'un échantillon de cellules d'un patient comprenant les étapes suivantes :
- 20 1) la mise en œuvre d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 7, et
- 2) mise en évidence d'un risque de développer une gammopathie monoclonale :
- a) si la proportion de cellules plasmocytaires tumorales parmi les cellules leucocytaires totales, d'après les résultats de l'analyse de l'étape d) du procédé selon l'invention, dépasse un seuil prédéfini à partir de résultats obtenus par le procédé selon l'invention sur des sujets contrôle sains;
- 25 et/ou
- b) si le nombre de plasmocytes tumoraux par unité de volume dépasse un seuil prédéfini.
9. Procédé de suivi *in vitro* de l'évolution de la maladie d'un patient atteint
30 d'une gammopathie monoclonale, à partir d'un premier et d'un second échantillon de cellules du patient, comprenant les étapes suivantes :
- i) la mise en œuvre d'un procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 7 dans un premier échantillon de cellules du patient
- ii) la mise en œuvre d'un procédé de détection selon l'une des
35 revendications 1 à 7 dans un second échantillon de cellules du patient,

ledit second échantillon ayant été prélevé après le prélèvement dudit premier échantillon, et

iii) la comparaison de l'analyse des résultats de l'étape d) obtenus avec le premier et le second échantillon, et

5 iv) le suivi de l'évolution de ladite gammopathie monoclonale dudit patient d'après les résultats de l'analyse de l'étape iii).

10. Composition comprenant au moins :

10 - un marqueur de la chaîne κ et un marqueur de la chaîne λ , émettant chacun un signal différent,

- un marqueur choisi parmi : un marqueur de CD38 ou un marqueur de CD138, ledit marqueur émettant un signal différent des deux premiers signaux,

15 - un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs, de CD spécifiques de cellules plasmocytaires normales sélectionnés parmi les marqueurs de CD19, CD27, CD45, CD81, CD5L, CD11a, CD16b, CD24, CD36, CD52, CD68, CD79a, CD80, CD82, CD84, CD99 et CD163, préférentiellement les marqueurs de CD19, CD27, CD45 et CD81, plus préférentiellement un marqueur de CD19 et un marqueur de CD27,
20 chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des trois premiers signaux, et

25 - un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs, plus préférentiellement au moins trois marqueurs de CD spécifiques de cellules plasmocytaires tumorales sélectionnés parmi les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD52, CD28, CD1D, CD2BP2, CD32c, CD47, CD59, CD109, CD229, CD300a et CD320, préférentiellement les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD52 et CD28, plus préférentiellement un marqueur de CD56, un marqueur de CD117 et un
30 marqueur de CD200, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des quatre premiers signaux.

11. Utilisation d'une composition comprenant au moins :

- un marqueur de la chaîne κ et un marqueur de la chaîne λ émettant un signal différent,

- un marqueur choisi parmi : un marqueur de CD38 et un marqueur de CD138, ledit marqueur émettant un signal différent des deux premiers signaux,
 - un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs de CD de cellules plasmocytaires normales sélectionnés parmi les marqueurs de CD19, CD27, CD45, CD81, CD5L, CD11a, CD16b, CD24, CD36, CD52, CD68, CD79a, CD80, CD82, CD84, CD99 et CD163, préférentiellement les marqueurs de CD19, CD27, CD45 et CD81, plus préférentiellement un marqueur de CD19 et un marqueur de CD27, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des trois premiers signaux, et
 - un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs, plus préférentiellement au moins trois marqueurs de CD de cellules plasmocytaires tumorales sélectionnés parmi les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD52, CD28, CD1D, CD2BP2, CD32c, CD47, CD59, CD109, CD229, CD300a et CD320, préférentiellement les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD52 et CD28, plus préférentiellement un marqueur de CD56, un marqueur de CD117 et un marqueur de CD200, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des quatre premiers des signaux,
- pour mettre en œuvre le procédé selon l'une des revendications 1 à 9.

12. Kit pour mettre en œuvre le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, comprenant au moins :
- un marqueur de la chaîne κ , et un marqueur de la chaîne λ , émettant chacun un signal différent ;
 - un marqueur de CD38 ou un marqueur de CD138 émettant un signal différent des deux premiers signaux;
 - un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs de CD de cellules plasmocytaires normales sélectionnés parmi les marqueurs de CD19, CD27, CD45, CD81, CD5L, CD11a, CD16b, CD24, CD36, CD52, CD68, CD79a, CD80, CD82, CD84, CD99 et CD163, préférentiellement les marqueurs de CD19, CD27, CD45 et CD81, plus préférentiellement un marqueur de CD19 et un marqueur de CD27, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des trois premiers signaux; et

- un ou plusieurs marqueur(s), préférentiellement au moins deux marqueurs, plus préférentiellement au moins trois marqueurs de CD de cellules plasmocytaires tumorales sélectionnés parmi les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD52, CD28, CD1D, CD2BP2, CD32c, CD47, CD59, CD109, CD229, CD300a et CD320, préférentiellement les marqueurs de CD56, CD117, CD200, CD20, CD52 et CD28, plus préférentiellement un marqueur de CD56, un marqueur de CD117 et un marqueur de CD200, chacun de ces un ou plusieurs marqueur(s) émettant un signal différent des quatre premiers signaux.
- 5
- 10 13. Kit selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un marqueur de prolifération cellulaire sélectionné parmi:
- des analogues de bases de type BrdU et un anticorps anti-BrdU conjugué à l'APC ou EdU et un azoture couplé à un fluorochrome, préférentiellement l'Alexa Fluor® 647 ; et/ou
 - 15 - des marqueurs de protéines du cycle cellulaire actif, par exemple un anticorps anti-Ki67 conjugué à un fluorochrome, préférentiellement l'Alexa Fluor 647® ; et/ou
 - des marqueurs d'acides désoxyribonucléiques (ADN), tel que le DAPI, PI, colorant Hoeschst (33342 ou 33258),
- 20 chacun du ou desdits marqueur(s) de prolifération cellulaire émettant un signal différent des signaux émis par les autres marqueurs présents dans ledit kit, en particulier différent des cinq premiers signaux.

BREVET D'INVENTION

DETECTION DE LA MALADIE RESIDUELLE DU MYELOME MULTIPLE

5

ABREGE DESCRIPTIF

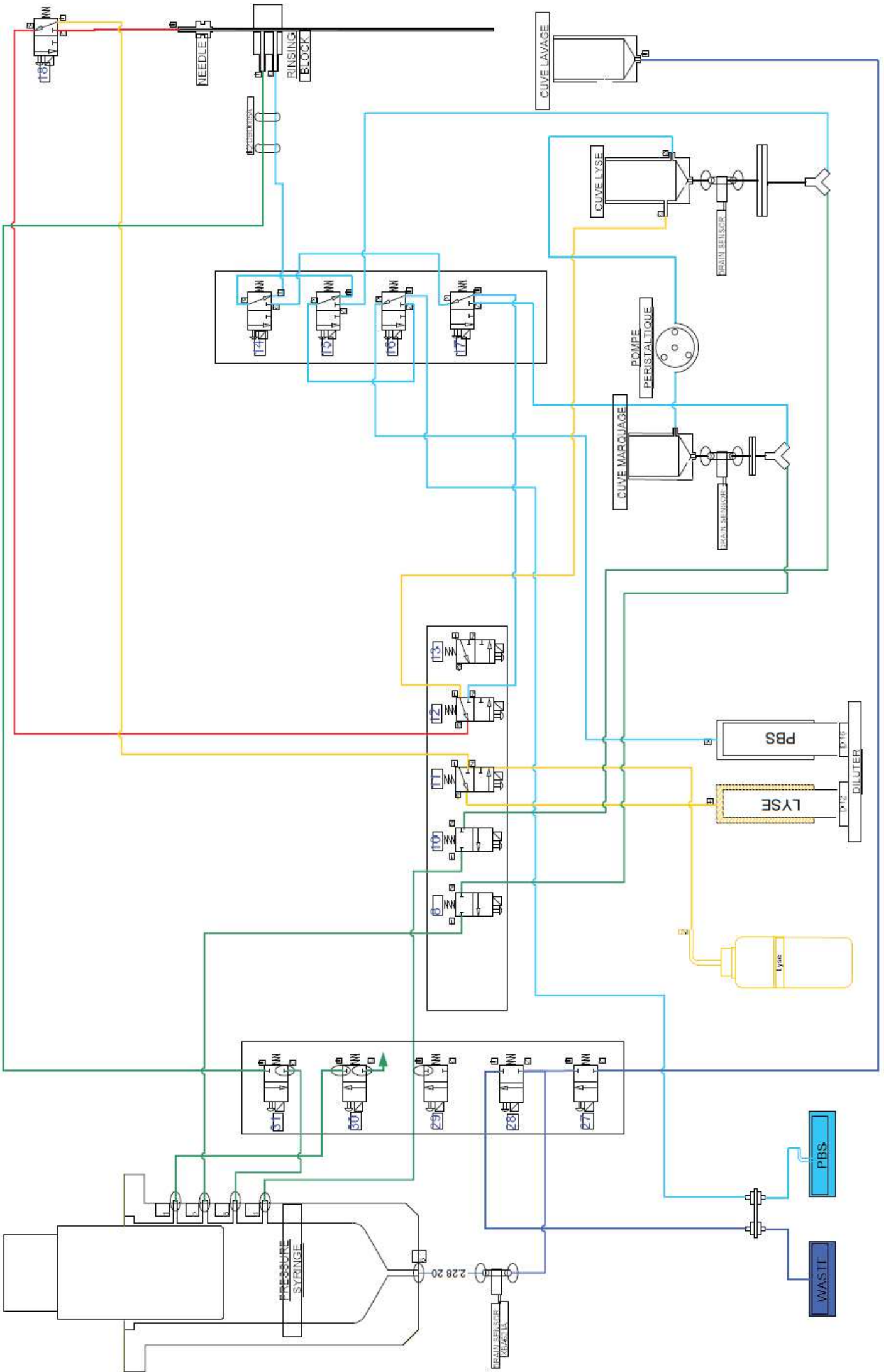
L'invention concerne un procédé de détection par cytométrie en flux de la présence
de cellules plasmocytaires normales et de cellules plasmocytaires tumorales dans un
10 échantillon de cellules d'un patient.

Annexe 3

Schéma du circuit hydropneumatique de la maquette de préparateur

La maquette de préparateur d'échantillons biologiques dédiés à l'analyse en CFM est composée des éléments suivant :

- Deux réactifs : PBS et Lyse
- Un raccord vers les déchets
- Une aiguille de prélèvement,
- Trois seringues pour la contrôler la circulation de l'air (PRESSURE SYRINGE), du PBS (DILUTER PBS) et de la lyse (DILUTER LYSE),
- Quinze électrovannes pour contrôler la circulation fluïdique,
- Trois cuves : cuve de lavage de l'aiguille de prélèvement, cuve de lyse et cuve de marquage,
- Deux filtres (filtre 1 et filtre 2)
- Deux capteurs de vidange placés au-dessus des filtres
- Une pompe péristaltique pour déplacer la solution de la cuve de lyse à la cuve de marquage
- Quatre moteurs pour commander l'aiguille de prélèvement, les trois seringues (un moteur pour la PRESSURE SYRINGE et un autre moteur pour le DILUTER) et la pompe péristaltique.



Références bibliographiques

A

Aghaeepour, N., Nikolic, R., Hoos, H.H., and Brinkman, R.R. (2011). Rapid cell population identification in flow cytometry data. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 79, 6–13.

Aghaeepour, N., Finak, G., Consortium, T.F., Consortium, T.D., Hoos, H., Mosmann, T.R., Brinkman, R., Gottardo, R., and Scheuermann, R.H. (2013). Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat. Methods* 10, 228–238.

Ahmad, I., LeBlanc, R., Cohen, S., Lachance, S., Kiss, T., Sauvageau, G., Roy, D.C., Busque, L., Delisle, J.-S., Bambace, N., et al. (2016). Favorable long-term outcome of patients with multiple myeloma using a frontline tandem approach with autologous and non-myeloablative allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 51, 529–535.

Alapat, D., Coviello-Malle, J., Owens, R., Qu, P., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., and Lorschach, R.B. (2012). Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* 137, 93–100.

Alcindor, T., Kimlinger, T., and Witzig, T.E. (2006). High expression of CD59 and CD55 on benign and malignant plasma cells. *Leuk. Lymphoma* 47, 919–921.

Alexanian, R., Bonnet, J., Gehan, E., Haut, A., Hewlett, J., Lane, M., Monto, R., and Wilson, H. (1972). Combination chemotherapy for multiple myeloma. *Cancer* 30, 382–389.

Allhusen, J.S., and Conboy, J.C. (2016). The Ins and Outs of Lipid Flip-Flop. *Acc. Chem. Res.*

Almeida, J., Orfao, A., Ocqueteau, M., Mateo, G., Corral, M., Caballero, M.D., Blade, J., Moro, M.J., Hernandez, J., and San Miguel, J.F. (1999). High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 107, 121–131.

Alsayed, Y., Haessler, J., Barlogie, B., Crowley, J., and Shaughnessy, J. (2009). Gene expression profiling (GEP) of cd 138-purified plasma cells (pc) in previously treated multiple myeloma (PTMM): Validating prognostic models developed in newly diagnosed MM (NDMM). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 8598.

Amidzadeh, Z., Behbahani, A.B., Erfani, N., Sharifzadeh, S., Ranjbaran, R., Moezi, L., Aboualizadeh, F., Okhovat, M.A., Alavi, P., and Azarpira, N. (2014). Assessment of different permeabilization methods

of minimizing damage to the adherent cells for detection of intracellular RNA by flow cytometry. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 6, 38–46.

Andersen, M.N., Abildgaard, N., Maniecki, M.B., Møller, H.J., and Andersen, N.F. (2014). Monocyte/macrophage-derived soluble CD163: a novel biomarker in multiple myeloma. *Eur. J. Haematol.* 93, 41–47.

Arroz, M., Came, N., Lin, P., Chen, W., Yuan, C., Lagoo, A., Monreal, M., de Tute, R., Vergilio, J.-A., Rawstron, A.C., et al. (2016). Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin. Cytom.* 90, 31–39.

Avet-Loiseau, H., Corre, J., Lauwers-Cances, V., Chretien, M.-L., Robillard, N., Leleu, X., Hulin, C., Gentil, C., Arnulf, B., Belhadj, K., et al. (2015). Evaluation of Minimal Residual Disease (MRD) By Next Generation Sequencing (NGS) Is Highly Predictive of Progression Free Survival in the IFM/DFCI 2009 Trial. *Blood* 126, 191–191.

Ayre, D.C., and Christian, S.L. (2016). CD24: A Rheostat That Modulates Cell Surface Receptor Signaling of Diverse Receptors. *Front. Cell Dev. Biol.* 4.

B

Barbe, L. (2001). Mécanisme d'adhérence des leucocytes aux fibres synthétiques. Application à la filtration sanguine. phdthesis. Université Paris-Diderot - Paris VII.

Bashashati, A., and Brinkman, R.R. (2009). A Survey of Flow Cytometry Data Analysis Methods. *Adv. Bioinforma.* 2009.

Bataille, R., Jago, G., Robillard, N., Barille-Nion, S., Harousseau, J.L., Moreau, P., Amiot, M., and Pellat-Deceunynck, C. (2006). The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 91, 1234–1240.

Bates, I. (2006). Chapter 6 - Bone marrow biopsy. In *Dacie and Lewis Practical Haematology* (Tenth Edition), (Philadelphia: Churchill Livingstone), pp. 115–130.

Benboubker, L., Dimopoulos, M.A., Dispenzieri, A., Catalano, J., Belch, A.R., Cavo, M., Pinto, A., Weisel, K., Ludwig, H., Bahlis, N., et al. (2014). Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *N. Engl. J. Med.* 371, 906–917.

- Ben-Dor, A., Shamir, R., and Yakhini, Z. (1999). Clustering gene expression patterns. *J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol.* 6, 281–297.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57, 289–300.
- Billadeau, D., Blackstadt, M., Greipp, P., Kyle, R.A., Oken, M.M., Kay, N., and Van Ness, B. (1991). Analysis of B-lymphoid malignancies using allele-specific polymerase chain reaction: a technique for sequential quantitation of residual disease. *Blood* 78, 3021–3029.
- Binsky-Ehrenreich, I., Marom, A., Sobotta, M.C., Shvidel, L., Berrebi, A., Hazan-Halevy, I., Kay, S., Alosin, A., Sagi, I., Goldenberg, D.M., et al. (2014). CD84 is a survival receptor for CLL cells. *Oncogene* 33, 1006–1016.
- Bladé, J., Rosiñol, L., Cibeira, M.T., Rovira, M., and Carreras, E. (2010). Hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma beyond 2010. *Blood* 115, 3655–3663.
- Bland, J.M., and Altman, D.G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet Lond. Engl.* 1, 307–310.
- Boddy, L., and Morris, C.W. (1999). Artificial neural networks for pattern recognition. In *Machine Learning Methods for Ecological Applications*, A.H. Fielding, ed. (Springer US), pp. 37–87.
- Boersma-Vreugdenhil, G.R., Kuipers, J., Van Stralen, E., Peeters, T., Michaux, L., Hagemeyer, A., Pearson, P.L., Clevers, H.C., and Bast, B.J.E.G. (2004). The recurrent translocation t(14;20)(q32;q12) in multiple myeloma results in aberrant expression of MAFB: a molecular and genetic analysis of the chromosomal breakpoint. *Br. J. Haematol.* 126, 355–363.
- Bolli, N., Avet-Loiseau, H., Wedge, D.C., Loo, P.V., Alexandrov, L.B., Martincorena, I., Dawson, K.J., Iorio, F., Nik-Zainal, S., Bignell, G.R., et al. (2014). Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat. Commun.* 5, 2997.
- Botta, C., Di Martino, M.T., Ciliberto, D., Cucè, M., Correale, P., Rossi, M., Tagliaferri, P., and Tassone, P. (2016). A gene expression inflammatory signature specifically predicts multiple myeloma evolution and patients survival. *Blood Cancer J.* 6, e511.
- Breiman, L., Friedman, J., Stone, C.J., and Olshen, R.A. (1984). *Classification and Regression Trees* (Taylor & Francis).

Bruin, A.M. de, Voermans, C., and Nolte, M.A. (2014). Impact of interferon- γ on hematopoiesis. *Blood* 124, 2479–2486.

Bueno, C., Lopes, L.F., and Menendez, P. (2007). Bone marrow stromal cell-derived Wnt signals as a potential underlying mechanism for cyclin D1 deregulation in multiple myeloma lacking t(11;14)(q13;q32). *Blood Cells. Mol. Dis.* 39, 366–368.

C

Camp, B.V., Durie, B.G., Spier, C., Waele, M.D., Riet, I.V., Vela, E., Frutiger, Y., Richter, L., and Grogan, T.M. (1990). Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood* 76, 377–382.

Capelle, M.A.H., Gurny, R., and Arvinte, T. (2008). High throughput methods to characterize protein permeation and release. *Int. J. Pharm.* 350, 272–278.

Caraux, A., Klein, B., Paiva, B., Bret, C., Schmitz, A., Fuhler, G.M., Bos, N.A., Johnsen, H.E., Orfao, A., Perez-Andres, M., et al. (2010). Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138⁻ and CD138⁺ plasma cells. *Haematologica* 95, 1016–1020.

Caraux, A., Vincent, L., Bouhya, S., Quittet, P., Moreaux, J., Requirand, G., Veyrone, J.-L., Olivier, G., Cartron, G., Rossi, J.-F., et al. (2012). Residual malignant and normal plasma cells shortly after high dose melphalan and stem cell transplantation. Highlight of a putative therapeutic window in Multiple Myeloma? *Oncotarget* 3, 1335–1347.

Chang, H., Sloan, S., Li, D., Zhuang, L., Yi, Q.-L., Chen, C.I., Reece, D., Chun, K., and Keith Stewart, A. (2004). The t(4;14) is associated with poor prognosis in myeloma patients undergoing autologous stem cell transplant. *Br. J. Haematol.* 125, 64–68.

Chen, T., Berno, T., and Zangari, M. (2012). Low-risk identification in multiple myeloma using a new 14-gene model. *Eur. J. Haematol.* 89, 28–36.

Chernyshev, A.V., Tarasov, P.A., Semianov, K.A., Nekrasov, V.M., Hoekstra, A.G., and Maltsev, V.P. (2008). Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: theoretical modeling and experimental verification. *J. Theor. Biol.* 251, 93–107.

Chesi, M., and Bergsagel, P.L. (2013). Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int. J. Hematol.* 97, 313.

Chesi, M., Nardini, E., Lim, R.S., Smith, K.D., Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. (1998). The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood* 92, 3025–3034.

Chien, S., Schmalzer, E.A., Lee, M.M., Impelluso, T., and Skalak, R. (1983). Role of white blood cells in filtration of blood cell suspensions. *Biorheology* 20, 11–27.

Christensen, J.H., Jensen, P.V., Kristensen, I.B., Abildgaard, N., Lodahl, M., and Rasmussen, T. (2012). Characterization of potential CD138 negative myeloma “stem cells.” *Haematologica* 97, e18–e20.

Clark, G.J., Rao, M., Ju, X., and Hart, D.N.J. (2007). Novel human CD4⁺ T lymphocyte subpopulations defined by CD300a/c molecule expression. *J. Leukoc. Biol.* 82, 1126–1135.

Cohen, C.M., and Foley, S.F. (1984). Biochemical characterization of complex formation by human erythrocyte spectrin, protein 4.1, and actin. *Biochemistry (Mosc.)* 23, 6091–6098.

Coulter, W.H., Heuschkel, F.L., and Berg, R.H. (1964). Method of making a scanner element for particle analyzers.

Coumans, F.A.W., van Dalum, G., Beck, M., and Terstappen, L.W.M.M. (2013a). Filter Characteristics Influencing Circulating Tumor Cell Enrichment from Whole Blood. *PLoS ONE* 8.

Coumans, F.A.W., van Dalum, G., Beck, M., and Terstappen, L.W.M.M. (2013b). Filtration parameters influencing circulating tumor cell enrichment from whole blood. *PloS One* 8, e61774.

Czuczman, M.S., Leonard, J.P., Jung, S., Johnson, J.L., Hsi, E.D., Byrd, J.C., and Cheson, B.D. (2012). Phase II trial of galiximab (anti-CD80 monoclonal antibody) plus rituximab (CALGB 50402): Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) score is predictive of upfront immunotherapy responsiveness. *Ann. Oncol.* 23, 2356–2362.

D

Daniels, T.R., Ortiz-Sánchez, E., Luria-Pérez, R., Quintero, R., Helguera, G., Bonavida, B., Martínez-Maza, O., and Penichet, M.L. (2011). An Antibody-based Multifaceted Approach Targeting the Human Transferrin Receptor for the Treatment of B-cell Malignancies. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 34, 500–508.

Daniels, T.R., Bernabeu, E., Rodríguez, J.A., Patel, S., Kozman, M., Chiappetta, D.A., Holler, E., Ljubimova, J.Y., Helguera, G., and Penichet, M.L. (2012). Transferrin receptors and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 291–317.

- Decaux, O., Hulin, C., and Grosbois, B. (2007). Traitement du myélome multiple. *Médecine Thérapeutique* 13, 437–449.
- Decaux, O., Lodé, L., Magrangeas, F., Charbonnel, C., Gouraud, W., Jézéquel, P., Attal, M., Harousseau, J.-L., Moreau, P., Bataille, R., 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 Myélome. *J. Clin. Oncol.* 26, 4798–4805.
- Demers, S., Kim, J., Legendre, P., and Legendre, L. (1992). Analyzing multivariate flow cytometric data in aquatic sciences. *Cytometry* 13, 291–298.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R., and Brown, P.O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680–686.
- Dimopoulos, M.A., Facon, T., Richardson, P.G.G., Orlowski, R.Z., San-Miguel, J.F., Lonial, S., Anderson, K.C., Moreau, P., Reece, D.E., Singhal, A., et al. (2012). ELOQUENT-1: A phase III, randomized, open-label trial of lenalidomide/dexamethasone with or without elotuzumab in subjects with previously untreated multiple myeloma (CA204-006). *J. Clin. Oncol.* 30.
- Dimopoulos, M.A., Oriol, A., Nahi, H., San-Miguel, J., Bahlis, N.J., Usmani, S.Z., Rabin, N., Orlowski, R.Z., Komarnicki, M., Suzuki, K., et al. (2016). Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 375, 1319–1331.
- Donato, F., Gay, F., Bringhen, S., Troia, R., and Palumbo, A. (2014). Monoclonal antibodies currently in Phase II and III trials for multiple myeloma. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1–18.
- van Dongen, J.J.M., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., van der Velden, V.H.J., Flores-Montero, J., Rawstron, A., Asnafi, V., Lécresse, Q., Lucio, P., et al. (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 26, 1908–1975.
- van de Donk, N.W.C.J., Kamps, S., Mutis, T., and Lokhorst, H.M. (2012). Monoclonal antibody-based therapy as a new treatment strategy in multiple myeloma. *Leukemia* 26, 199–213.
- Dorwal, P., Thakur, R., and Rawat, S. (2014). CD138 expression in plasma cells is volatile and time-lag dependent. *Egypt. J. Haematol.* 39, 258–259.

Durie, B.G.M., 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, 842–854.

Durie, B.G.M., Harousseau, J.-L., Miguel, J.S., Bladé, J., Barlogie, B., Anderson, K., Gertz, M., Dimopoulos, M., Westin, J., Sonneveld, P., et al. (2006). International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 20, 1467–1473.

E

Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14863–14868.

Engelhardt, M., Terpos, E., Kleber, M., Gay, F., Wäsch, R., Morgan, G., Cavo, M., van de Donk, N., Beilhack, A., Bruno, B., et al. (2014). European Myeloma Network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Haematologica* 99, 232–242.

F

Faham, M., Zheng, J., Moorhead, M., Carlton, V.E.H., Stow, P., Coustan-Smith, E., Pui, C.-H., and Campana, D. (2012). Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 120, 5173–5180.

Favreau, M., Vanderkerken, K., Elewaut, D., Venken, K., Menu, E., Favreau, M., Vanderkerken, K., Elewaut, D., Venken, K., and Menu, E. (2016). Does an NKT-cell-based immunotherapeutic approach have a future in multiple myeloma? *Oncotarget* 7, 23128–23140.

Finak, G., Bashashati, A., Brinkman, R., and Gottardo, R. (2009). Merging mixture components for cell population identification in flow cytometry. *Adv. Bioinforma.* 247646.

Fleming, A. (1926). A Simple Method of Removing Leucocytes from Blood. *Br. J. Exp. Pathol.* 7, 281–286.

Flores-Montero, J., de Tute, R., Paiva, B., Perez, J.J., Böttcher, S., Wind, H., Sanoja, L., Puig, N., Lecomte, Q., Vidriales, M.B., et al. (2016a). Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin. Cytom.* 90, 61–72.

Flores-Montero, J., de Tute, R., Paiva, B., Perez, J.J., Böttcher, S., Wind, H., Sanoja, L., Puig, N., Lecomte, Q., Vidriales, M.B., et al. (2016b). Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin. Cytom.* 90, 61–72.

Fonseca, R., Barlogie, B., Bataille, R., Bastard, C., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Davies, F.E., Drach, J., Greipp, P.R., Kirsch, I.R., et al. (2004). Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma. *Cancer Res.* 64, 1546–1558.

Frigyesi, I., Adolfsson, J., Ali, M., Christophersen, M.K., Johnsson, E., Turesson, I., Gullberg, U., Hansson, M., and Nilsson, B. (2014). Robust isolation of malignant plasma cells in multiple myeloma. *Blood* blood-2013-09-529800.

G

García-Sanz, R., González-Fraile, M.I., Mateo, G., Hernández, J.M., López-Berges, M.C., de las Heras, N., Fernández-Calvo, J., Ortega, F., Portero, J.A., Báñez, A., et al. (2004). Proliferative activity of plasma cells is the most relevant prognostic factor in elderly multiple myeloma patients. *Int. J. Cancer* 112, 884–889.

Ge, Y., and Sealfon, S.C. (2012). flowPeaks: a fast unsupervised clustering for flow cytometry data via K-means and density peak finding. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 28, 2052–2058.

Giammartino, D.C.D., and Apostolou, E. (2016). The Chromatin Signature of Pluripotency: Establishment and Maintenance. *Curr. Stem Cell Rep.* 2, 255–262.

Glitza, I.C., Lu, G., Shah, R., Bashir, Q., Shah, N., Champlin, R.E., Shah, J., Orlowski, R.Z., and Qazilbash, M.H. (2015). Chromosome 8q24.1/c-MYC abnormality: a marker for high-risk myeloma. *Leuk. Lymphoma* 56, 602–607.

Gonsalves, W.I., Rajkumar, S.V., Gupta, V., Morice, W.G., Timm, M.M., Singh, P.P., Dispenzieri, A., Buadi, F.K., Lacy, M.Q., Kapoor, P., et al. (2014). Quantification of clonal circulating plasma cells in newly diagnosed multiple myeloma: implications for redefining high-risk myeloma. *Leukemia* 28, 2060–2065.

Gottfried, E.L. (1967). Lipids of human leukocytes: relation to cell type. *J. Lipid Res.* 8, 321–327.

Grant, C.W., and McConnell, H.M. (1974). Glycophorin in lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 4653–4657.

Greipp, P.R., and Kumar, S. (2005). Plasma cell labeling index. *Methods Mol. Med.* 113, 25–35.

Greipp, P.R., Miguel, J.S., Durie, B.G.M., Crowley, J.J., Barlogie, B., Bladé, J., Boccadoro, M., Child, J.A., Avet-Loiseau, H., Kyle, R.A., et al. (2005). International Staging System for Multiple Myeloma. *J. Clin. Oncol.* 23, 3412–3420.

Gupta, R., Bhaskar, A., Kumar, L., Sharma, A., and Jain, P. (2009). Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* 132, 728–732.

H

Hahne, F., LeMeur, N., Brinkman, R.R., Ellis, B., Haaland, P., Sarkar, D., Spidlen, J., Strain, E., and Gentleman, R. (2009). flowCore: a Bioconductor package for high throughput flow cytometry. *BMC Bioinformatics* 10, 106.

Hale, G., and Waldmann, H. (2000). From Laboratory to Clinic : The Story of CAM PA TH-1. *Methods Mol. Med.* 40, 243–266.

Harousseau, J.-L., Dreyling, M., and ESMO Guidelines Working Group (2010). Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* ESMO 21 Suppl 5, v155-157.

Hartmann, L., Biggerstaff, J.S., Chapman, D.B., Scott, J.M., Johnson, K.R., Ghirardelli, K.M., Fritschle, W.K., Martinez, D.L., Bennington, R.K., de Baca, M.E., et al. (2011). Detection of genomic abnormalities in multiple myeloma: the application of FISH analysis in combination with various plasma cell enrichment techniques. *Am. J. Clin. Pathol.* 136, 712–720.

Heinze, M., Kofler, M., and Freund, C. (2007). Investigating the functional role of CD2BP2 in T cells. *Int. Immunol.* 19, 1313–1318.

Hideshima, T., and Anderson, K.C. (2002). Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nat. Rev. Cancer* 2, 927–937.

Hoffman, B., and Liebermann, D.A. (2008). Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* 27, 6462–6472.

Holm, S. (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scand. J. Stat.* 6, 65–70.

Hose, D., Rème, T., Hielscher, T., Moreaux, J., Messner, T., Seckinger, A., Benner, A., Shaughnessy, J.D., Barlogie, B., Zhou, Y., et al. (2011a). Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica* 96, 87–95.

Hose, D., Reme, T., Hielscher, T., Moreaux, J., Messner, T., Seckinger, A., Benner, A., Shaughnessy, J.D., Barlogie, B., Zhou, Y., et al. (2011b). Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica* 96, 87–95.

Hubbell, E., Liu, W.-M., and Mei, R. (2002). Robust estimators for expression analysis. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 18, 1585–1592.

Husak, Z., and Dworzak, M.N. (2012). CD99 ligation upregulates HSP70 on acute lymphoblastic leukemia cells and concomitantly increases NK cytotoxicity. *Cell Death Dis.* 3, e425.

I

Ise, M., Matsubayashi, K., Tsujimura, H., and Kumagai, K. (2016). Loss of CD38 Expression in Relapsed Refractory Multiple Myeloma. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 16, e59–e64.

J

Jagannath, S., Barlogie, B., Berenson, J., Siegel, D., Irwin, D., Richardson, P.G., Niesvizky, R., Alexanian, R., Limentani, S.A., Alsina, M., et al. (2004). A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *Br. J. Haematol.* 127, 165–172.

Jego, G., Robillard, N., Puthier, D., Amiot, M., Accard, F., Pineau, D., Harousseau, J.L., Bataille, R., and Pellat-Deceunynck, C. (1999). Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 94, 701–712.

Jeong, T.-D., Park, C.-J., Shim, H., Jang, S., Chi, H.-S., Yoon, D.H., Kim, D.-Y., Lee, J.-H., Lee, J.-H., Suh, C., et al. (2012). Simplified flow cytometric immunophenotyping panel for multiple myeloma, CD56/CD19/CD138(CD38)/CD45, to differentiate neoplastic myeloma cells from reactive plasma cells. *Korean J. Hematol.* 47, 260–266.

Jourdan, M., Ferlin, M., Legouffe, E., Horvathova, M., Liautard, J., Rossi, J.F., Wijdenes, J., Brochier, J., and Klein, B. (1998). The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br. J. Haematol.* 100, 637–646.

Jourdan, M., Caraux, A., De Vos, J., Fiol, G., Larroque, M., Cognot, C., Bret, C., Duperray, C., Hose, D., and Klein, B. (2009). An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood* 114, 5173–5181.

K

Kalff, A., and Spencer, A. (2012). The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies. *Blood Cancer J.* 2, e89.

Karnell, J.L., Dimasi, N., Karnell, F.G., Fleming, R., Kuta, E., Wilson, M., Wu, H., Gao, C., Herbst, R., and Ettinger, R. (2014). CD19 and CD32b Differentially Regulate Human B Cell Responsiveness. *J. Immunol. Author Choice* 192, 1480–1490.

Kassambara, A., Hose, D., Moreaux, J., Walker, B.A., Protopopov, A., Rème, T., Pellestor, F., Pantesco, V., Jauch, A., Morgan, G., et al. (2012). Genes with a spike expression are clustered in chromosome (sub)bands and spike (sub)bands have a powerful prognostic value in patients with multiple myeloma. *Haematologica* 97, 622–630.

Kassambara, A., Gourzones-Dmitriev, C., Sahota, S., Rème, T., Moreaux, J., Goldschmidt, H., Constantinou, A., Pasero, P., Hose, D., and Klein, B. (2014). A DNA repair pathway score predicts survival in human multiple myeloma: the potential for therapeutic strategy. *Oncotarget* 5, 2487–2498.

Kassambara, A., Rème, T., Jourdan, M., Fest, T., Hose, D., Tarte, K., and Klein, B. (2015). GenomicScope: an easy-to-use web tool for gene expression data analysis. Application to investigate the molecular events in the differentiation of B cells into plasma cells. *PLoS Comput. Biol.* 11, e1004077.

Kastritis, E., Terpos, E., Roussou, M., Gavriatopoulou, M., Migkou, M., Eleutherakis-Papaiakovou, E., Fotiou, D., Ziogas, D., Panagiotidis, I., Kafantari, E., et al. (2016). Evaluation of the Revised International Staging System (R-ISS) in an independent cohort of unselected patients with multiple myeloma. *Haematologica*.

Kim, D., Wang, J., Willingham, S.B., Martin, R., Wernig, G., and Weissman, I.L. (2012). Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. *Leukemia* 26, 2538–2545.

Kim, J., Lee, H., and Shin, S. (2015). Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. *J. Cell. Biotechnol.* 1, 63–79.

Kobayashi, S., Hyo, R., Amitani, Y., Tanaka, M., Hashimoto, C., Sakai, R., Tamura, T., Motomura, S., and Maruta, A. (2006). Four-color flow cytometric analysis of myeloma plasma cells. *Am. J. Clin. Pathol.* 126, 908–915.

Kuiper, R., Broyl, A., de Knecht, Y., van Vliet, M.H., van Beers, E.H., van der Holt, B., el Jarari, L., Mulligan, G., Gregory, W., Morgan, G., et al. (2012). A gene expression signature for high-risk multiple myeloma. *Leukemia* 26, 2406–2413.

Kukreja, A., Radfar, S., Sun, B.-H., Insogna, K., and Dhodapkar, M.V. (2009). Dominant role of CD47-thrombospondin-1 interactions in myeloma-induced fusion of human dendritic cells: implications for bone disease. *Blood* 114, 3413–3421.

Kumar, S., Kimlinger, T., and Morice, W. (2010). Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 23, 433–451.

Kumar, S., Paiva, B., Anderson, K.C., Durie, B., Landgren, O., Moreau, P., Munshi, N., Lonial, S., Bladé, J., Mateos, M.-V., et al. (2016). International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 17, e328–e346.

Kumar, S.K., Mikhael, J.R., Buadi, F.K., Dingli, D., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Gertz, M.A., Greipp, P.R., Hayman, S.R., Kyle, R.A., et al. (2009). Management of Newly Diagnosed Symptomatic Multiple Myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines. *Mayo Clin. Proc.* 84, 1095–1110.

Kumar, S.K., Lee, J.H., Lahuerta, J.J., Morgan, G., Richardson, P.G., Crowley, J., Haessler, J., Feather, J., Hoering, A., Moreau, P., et al. (2012). Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multicenter international myeloma working group study. *Leukemia* 26, 149–157.

Kyle, R.A., Gertz, M.A., Witzig, T.E., Lust, J.A., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Rajkumar, S.V., Offord, J.R., Larson, D.R., et al. (2003). Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin. Proc.* 78, 21–33.

L

van Laar, R., Flinchum, R., Brown, N., Ramsey, J., Riccitelli, S., Heuck, C., Barlogie, B., and Shaughnessy, J.D. (2014). Translating a gene expression signature for multiple myeloma prognosis into a robust high-throughput assay for clinical use. *BMC Med. Genomics* 7, 25.

Lacroux, C., Bougard, D., Litaie, C., Simmons, H., Corbiere, F., Dernis, D., Tardivel, R., Morel, N., Simon, S., Lugan, S., et al. (2012). Impact of leucocyte depletion and prion reduction filters on TSE blood borne transmission. *PLoS One* 7, e42019.

Ladetto, M., Brüggemann, M., Monitillo, L., Ferrero, S., Pepin, F., Drandi, D., Barbero, D., Palumbo, A., Passera, R., Boccadoro, M., et al. (2014). Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia* 28, 1299–1307.

Lahuerta, J.J., Martinez-Lopez, J., Serna, J. de la, Bladé, J., Grande, C., Alegre, A., Vazquez, L., García-Laraña, J., Sureda, A., Rubia, J. de la, 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, 438–446.

Lai, S.-C., Nakayama, Y., Sequeira, J.M., and Quadros, E.V. (2011). Down-regulation of Transcobalamin Receptor TCbIR/CD320 by siRNA Inhibits Cobalamin uptake and Proliferation of Cells in Culture. *Exp. Cell Res.* 317, 1603–1607.

Landgren, O., and Owen, R.G. (2016). Better therapy requires better response evaluation: Paving the way for minimal residual disease testing for every myeloma patient. *Cytometry B Clin. Cytom.* 90, 14–20.

Landgren, O., and Rajkumar, S.V. (2016). New Developments in Diagnosis, Prognosis, and Assessment of Response in Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 5428–5433.

Landgren, O., Gormley, N., Turley, D., Owen, R.G., Rawstron, A., Paiva, B., Barnett, D., Arroz, M., Wallace, P., Durie, B., et al. (2014). Flow cytometry detection of minimal residual disease in multiple myeloma: Lessons learned at FDA-NCI roundtable symposium. *Am. J. Hematol.* 89, 1159–1160.

Lankry, D., Rovis, T.L., Jonjic, S., and Mandelboim, O. (2013). The interaction between CD300a and phosphatidylserine inhibits tumor cell killing by NK cells. *Eur. J. Immunol.* 43, 2151–2161.

Lee, G., Spring, F.A., Parsons, S.F., Mankelow, T.J., Peters, L.L., Koury, M.J., Mohandas, N., Anstee, D.J., and Chasis, J.A. (2003). Novel secreted isoform of adhesion molecule ICAM-4: potential regulator of membrane-associated ICAM-4 interactions. *Blood* 101, 1790–1797.

Leo, R., Boeker, M., Peest, D., Hein, R., Bartl, R., Gessner, J.E., Selbach, J., Wacker, G., and Deicher, H. (1992). Multiparameter analyses of normal and malignant human plasma cells: CD38⁺⁺, CD56⁺, CD54⁺, cIg⁺ is the common phenotype of myeloma cells. *Ann. Hematol.* 64, 132–139.

- Lewis, S.M. (2006). Chapter 2 - Reference ranges and normal values. In Dacie and Lewis Practical Haematology (Tenth Edition), (Philadelphia: Churchill Livingstone), pp. 11–24.
- Lin, P., Owens, R., Tricot, G., and Wilson, C.S. (2004). Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* 121, 482–488.
- Liu, H., Yuan, C., Heinerich, J., Braylan, R., Chang, M., Wingard, J., and Moreb, J. (2008). Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: A retrospective study. *Leuk. Lymphoma* 49, 306–314.
- Lo, K., Brinkman, R.R., and Gottardo, R. (2008). Automated gating of flow cytometry data via robust model-based clustering. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 73, 321–332.
- Lohr, J.G., Stojanov, P., Carter, S.L., Cruz-Gordillo, P., Lawrence, M.S., Auclair, D., Sougnez, C., Knoechel, B., Gould, J., Saksena, G., et al. (2014). Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell* 25, 91.
- Loisel, S., André, P.-A., Golay, J., Buchegger, F., Kadouche, J., Cérutti, M., Bologna, L., Kosinski, M., Viertl, D., Delaloye, A.B., et al. (2011). Antitumour effects of single or combined monoclonal antibodies directed against membrane antigens expressed by human B cells leukaemia. *Mol. Cancer* 10, 42.
- Lokhorst, H.M., Plesner, T., Laubach, J.P., Nahi, H., Gimsing, P., Hansson, M., Minnema, M.C., Lassen, U., Krejcik, J., Palumbo, A., et al. (2015). Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 373, 1207–1219.
- Longley, R.E., and Stewart, D. (1989). Recovery of functional human lymphocytes from Leukotrap filters. *J. Immunol. Methods* 121, 33–38.
- Lonial, S., and Kaufman, J.L. (2013). Non-secretory myeloma: a clinician's guide. *Oncol. Williston Park N 27*, 924–928, 930.
- Lonial, S., Dimopoulos, M., Palumbo, A., White, D., Grosicki, S., Spicka, I., Walter-Croneck, A., Moreau, P., Mateos, M.-V., Magen, H., et al. (2015). Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 373, 621–631.
- Lorent, J.H., Quetin-Leclercq, J., and Mingeot-Leclercq, M.-P. (2014). The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells. *Org. Biomol. Chem.* 12, 8803–8822.

Lugli, E., Roederer, M., and Cossarizza, A. (2010). Data Analysis in Flow Cytometry: The Future Just Started. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 77, 705–713.

M

Mahadevah, D., Mark C Lanasa, Maria Whelden, Susan J Faas, Terrie L Ulery, Anjli Kukreja, Lan Li, Camille L Bedrosian, and Leonard T. Heffner (2010). First-In-Human Phase I Dose Escalation Study of a Humanized Anti-CD200 Antibody (Samalizumab) In Patients with Advanced Stage B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL) or Multiple Myeloma (MM).

Mailankody, S., Korde, N., Lesokhin, A.M., Lendvai, N., Hassoun, H., Stetler-Stevenson, M., and Landgren, O. (2015). Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 12, 286–295.

Manaargadoo-Catin, M., Ali-Cherif, A., Pougna, J.-L., and Perrin, C. (2016). Hemolysis by surfactants — A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 228, 1–16.

Marsee, D.K., Li, B., and Dorfman, D.M. (2010). Single tube, six-color flow cytometric analysis is a sensitive and cost-effective technique for assaying clonal plasma cells. *Am. J. Clin. Pathol.* 133, 694–699.

Martinez-Lopez, J., Fernández-Redondo, E., García-Sánz, R., Montalbán, M.A., Martínez-Sánchez, P., Pavia, B., Mateos, M.V., Rosiñol, L., Martín, M., Ayala, R., et al. (2013). Clinical applicability and prognostic significance of molecular response assessed by fluorescent-PCR of immunoglobulin genes in multiple myeloma. Results from a GEM/PETHEMA study. *Br. J. Haematol.* 163, 581–589.

Martinez-Lopez, J., Lahuerta, J.J., Pepin, F., González, M., Barrio, S., Ayala, R., Puig, N., Montalban, M.A., Paiva, B., Weng, L., et al. (2014a). Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 123, 3073–3079.

Martinez-Lopez, J., Lahuerta, J.J., Pepin, F., González, M., Barrio, S., Ayala, R., Puig, N., Montalban, M.A., Paiva, B., Weng, L., et al. (2014b). Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. *Blood* 123, 3073–3079.

Martínez-López, J., Paiva, B., López-Anglada, L., Mateos, M.-V., Cedena, T., Vidriales, M.-B., Sáez-Gómez, M.A., Contreras, T., Oriol, A., Rapado, I., et al. (2015). Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: contribution of sFLC and bone marrow clonality. *Blood* 126, 858–862.

- Mascher, B., Schlenke, P., and Seyfarth, M. (1999). Expression and kinetics of cytokines determined by intracellular staining using flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 223, 115–121.
- Mateo, G., Montalbán, M.A., Vidriales, M.-B., Lahuerta, J.J., Mateos, M.V., Gutiérrez, N., Rosiñol, L., Montejano, L., Bladé, J., Martínez, R., 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, 2737–2744.
- Mateos, M.-V., Cavo, M., Jakubowiak, A.J., Carson, R.L., Qi, M., Bandekar, R., Crist, W., Ahmadi, T., and Miguel, J.F.S. (2015). A randomized open-label study of bortezomib, melphalan, and prednisone (VMP) versus daratumumab (DARA) plus VMP in patients with previously untreated multiple myeloma (MM) who are ineligible for high-dose therapy: 54767414MMY3007 (Alcyone). *J. Clin. Oncol.* 33.
- Matheis, G., Scholz, M., Simon, A., Dzemali, O., and Moritz, A. (2001). Leukocyte filtration in cardiac surgery: a review. *Perfusion* 16, 361–370.
- Mathiot, C., Teillaud, J.-L., Elmalek, M., Mosseri, V., Euller-Ziegler, L., Daragon, A., Grosbois, B., Michaux, J.-L., Facon, T., Bernard, J.-F., et al. (1993). Correlation between soluble serum CD16 (sCD16) levels and disease stage in patients with multiple myeloma. *J. Clin. Immunol.* 13, 41–48.
- Mathiot, C., Galon, J., Tartour, E., Teillaud, J.L., Facon, T., Bataille, R., Fridman, W.H., and Sautès, C. (1999). Soluble CD16 in Plasma Cell Dyscrasias. *Leuk. Lymphoma* 32, 467–474.
- Mathis, S., Chapuis, N., Borgeot, J., Maynadié, M., Fontenay, M., Béné, M.-C., Guy, J., and Bardet, V. (2014). Comparison of cross-platform flow cytometry minimal residual disease evaluation in multiple myeloma using a common antibody combination and analysis strategy. *Cytometry B Clin. Cytom.*
- Meyer, T.P.H., Zehnter, I., Hofmann, B., Zaisserer, J., Burkhart, J., Rapp, S., Weinauer, F., Schmitz, J., and Illert, W.E. (2005). Filter Buffy Coats (FBC): a source of peripheral blood leukocytes recovered from leukocyte depletion filters. *J. Immunol. Methods* 307, 150–166.
- Moreaux, J., Hose, D., Reme, T., Jourdan, E., Hundemer, M., Legouffe, E., Moine, P., Bourin, P., Moos, M., Corre, J., et al. (2006). CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 108, 4194–4197.
- Moreaux, J., Veyrune, J.L., Reme, T., De Vos, J., and Klein, B. (2008). CD200: a putative therapeutic target in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 117–122.

Moreaux, J., Klein, B., Bataille, R., Descamps, G., Maïga, S., Hose, D., Goldschmidt, H., Jauch, A., Rème, T., Jourdan, M., et al. (2011). A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* 96, 574–582.

Moreaux, J., Rème, T., Leonard, W., Veyrune, J.-L., Requirand, G., Goldschmidt, H., Hose, D., and Klein, B. (2012). Development of Gene Expression–Based Score to Predict Sensitivity of Multiple Myeloma Cells to DNA Methylation Inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 11, 2685–2692.

Morgan, G.J., Walker, B.A., and Davies, F.E. (2012). The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat. Rev. Cancer* 12, 335–348.

Morice, W.G., Hanson, C.A., Kumar, S., Frederick, L.A., Lesnick, C.E., and Greipp, P.R. (2007). Novel multi-parameter flow cytometry sensitively detects phenotypically distinct plasma cell subsets in plasma cell proliferative disorders. *Leukemia* 21, 2043–2046.

Morris, S.J. (2001). Leukocyte reduction in cardiovascular surgery. *Perfusion* 16, 371–380.

Muccio, V.E., Saraci, E., Gilestro, M., Gattei, V., Zucchetto, A., Astolfi, M., Ruggeri, M., Marzanati, E., Passera, R., Palumbo, A., et al. (2016). Multiple myeloma: New surface antigens for the characterization of plasma cells in the era of novel agents. *Cytometry B Clin. Cytom.* 90, 81–90.

Mulligan, G., Mitsiades, C., Bryant, B., Zhan, F., Chng, W.J., Roels, S., Koenig, E., Fergus, A., Huang, Y., Richardson, P., et al. (2007). Gene expression profiling and correlation with outcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood* 109, 3177–3188.

Murphy, R.F. (1985). Automated identification of subpopulations in flow cytometric list mode data using cluster analysis. *Cytometry* 6, 302–309.

N

Nagata, K., Nakamura, T., Kitamura, F., Kuramochi, S., Taki, S., Campbell, K.S., and Karasuyama, H. (1997). The Ig alpha/Igbeta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity* 7, 559–570.

Nakayama, S., Yokote, T., Hirata, Y., Iwaki, K., Akioka, T., Miyoshi, T., Takayama, A., Nishiwaki, U., Masuda, Y., Ikemoto, T., et al. (2012). An approach for diagnosing plasma cell myeloma by three-color flow cytometry based on kappa/lambda ratios of CD38-gated CD138(+) cells. *Diagn. Pathol.* 7, 131.

Naumann, U., Luta, G., and Wand, M.P. (2010). The curvHDR method for gating flow cytometry samples. *BMC Bioinformatics* 11, 44.

O

O'Connell, F.P., Pinkus, J.L., and Pinkus, G.S. (2004). CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker. *Am. J. Clin. Pathol.* 121, 254–263.

Ocqueteau, M., Orfao, A., Almeida, J., Blade, J., Gonzalez, M., Garcia-Sanz, R., Lopez-Berges, C., Moro, M.J., Hernandez, J., Escribano, L., 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, 1655–1665.

Oldaker, T.A., Wallace, P.K., and Barnett, D. (2016). Flow cytometry quality requirements for monitoring of minimal disease in plasma cell myeloma. *Cytometry B Clin. Cytom.* 90, 40–46.

Olteanu, H., Harrington, A.M., and Kroft, S.H. (2012). CD200 expression in plasma cells of nonmyeloma immunoproliferative disorders: clinicopathologic features and comparison with plasma cell myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* 138, 867–876.

P

Paíno, T., Paiva, B., Sayagués, J.M., Mota, I., Carvalheiro, T., Corchete, L.A., Aires-Mejía, I., Pérez, J.J., Sanchez, M.L., Barcena, P., et al. (2015). Phenotypic identification of subclones in multiple myeloma with different chemoresistant, cytogenetic and clonogenic potential. *Leukemia* 29, 1186–1194.

Paiva, B., Vidriales, M.-B., Cerveró, J., Mateo, G., Pérez, J.J., Montalbán, M.A., Sureda, A., Montejano, L., Gutiérrez, N.C., Coca, A.G. de, 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, 4017–4023.

Paiva, B., Almeida, J., Pérez-Andrés, M., Mateo, G., López, A., Rasillo, A., Vidriales, M.-B., López-Berges, M.-C., Miguel, J.F.S., and Orfao, A. (2010). Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin. Cytom.* 78, 239–252.

Paiva, B., Martinez-Lopez, J., Vidriales, M.-B., Mateos, M.-V., Montalban, M.-A., Fernandez-Redondo, E., Alonso, L., Oriol, A., Teruel, A.-I., de Paz, R., et al. (2011). Comparison of Immunofixation, Serum

Free Light Chain, and Immunophenotyping for Response Evaluation and Prognostication in Multiple Myeloma. *J. Clin. Oncol.* 29, 1627–1633.

Paiva, B., Gutiérrez, N.C., Rosiñol, L., Vídriales, M.-B., Montalbán, M.-Á., Martínez-López, J., Mateos, M.-V., Cibeira, M.-T., Cordon, L., Oriol, A., et al. (2012a). High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 119, 687–691.

Paiva, B., Vídriales, M.-B., Montalbán, M.-Á., Pérez, J.J., Gutiérrez, N.C., Rosiñol, L., Martínez-López, J., Mateos, M.-V., Cordon, L., Oriol, A., et al. (2012b). Multiparameter flow cytometry evaluation of plasma cell DNA content and proliferation in 595 transplant-eligible patients with myeloma included in the Spanish GEM2000 and GEM2005<65y trials. *Am. J. Pathol.* 181, 1870–1878.

Paiva, B., Paino, T., Sayagues, J.-M., Garayoa, M., San-Segundo, L., Martín, M., Mota, I., Sanchez, M.-L., Bárcena, P., Aires-Mejia, I., et al. (2013). Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. *Blood* 122, 3591–3598.

Paiva, B., Chandia, M., Puig, N., Vidriales, M.-B., Perez, J.J., Lopez-Corral, L., Ocio, E.M., Garcia-Sanz, R., Gutierrez, N.C., Jimenez-Ubieto, A., et al. (2014). The prognostic value of multiparameter flow cytometry minimal residual disease assessment in relapse multiple myeloma. *Haematologica*.

Paiva, B., van Dongen, J.J.M., and Orfao, A. (2015a). New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood* 125, 3059–3068.

Paiva, B., Chandia, M., Puig, N., Vidriales, M.-B., Perez, J.J., Lopez-Corral, L., Ocio, E.M., Garcia-Sanz, R., Gutierrez, N.C., Jimenez-Ubieto, A., et al. (2015b). The prognostic value of multiparameter flow cytometry minimal residual disease assessment in relapsed multiple myeloma. *Haematologica* 100, e53–e55.

Paiva, B., Cedena, M.-T., Puig, N., Arana, P., Vidriales, M.-B., Cordon, L., Flores-Montero, J., Gutierrez, N.C., Martín-Ramos, M.-L., Martinez-Lopez, J., et al. (2016). Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients. *Blood* 127, 3165–3174.

Paiva, B., Puig, N., Cedena, M.T., de Jong, B.G., Ruiz, Y., Rapado, I., Martinez-Lopez, J., Cordon, L., Alignani, D., Delgado, J.A., et al. (2017). Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. *Leukemia* 31, 382–392.

- Palumbo, A., Avet-Loiseau, H., Oliva, S., Lokhorst, H.M., Goldschmidt, H., Rosinol, L., Richardson, P., Caltagirone, S., Lahuerta, J.J., Facon, T., et al. (2015). Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J. Clin. Oncol.* 33, 2863–2869.
- Palumbo, A., Chanan-Khan, A., Weisel, K., Nooka, A.K., Masszi, T., Beksac, M., Spicka, I., Hungria, V., Munder, M., Mateos, M.V., et al. (2016). Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 375, 754–766.
- Parks, D.R., Roederer, M., and Moore, W.A. (2006). A new “Logicle” display method avoids deceptive effects of logarithmic scaling for low signals and compensated data. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 69, 541–551.
- Peceliunas, V., Janiulioniene, A., Matuzeviciene, R., and Griskevicius, L. (2011). Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors. *Cytometry B Clin. Cytom.* 80, 318–323.
- Perez, O.D., Krutzik, P.O., and Nolan, G.P. (2004). Flow cytometric analysis of kinase signaling cascades. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 263, 67–94.
- Pietersz, R.N.I., van der Meer, P.F., and Seghatchian, M.J. (1998). Update on Leucocyte Depletion of Blood Components by Filtration. *Transfus. Sci.* 19, 321–328.
- Plonquet, A. (2013). Différenciation lymphocytaire B normale. *Rev. Francoph. Lab.* 2013, 27–35.
- Pojero, F., Flores-Montero, J., Sanoja, L., Pérez, J.J., Puig, N., Paiva, B., Bottcher, S., van Dongen, J.J.M., Orfao, A., and EuroFlow group (2016). Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases. *Cytometry B Clin. Cytom.* 90, 91–100.
- Prochownik, E.V. (2008). c-Myc: linking transformation and genomic instability. *Curr. Mol. Med.* 8, 446–458.
- Puig, N., Sarasquete, M.E., Balanzategui, A., Martínez, J., Paiva, B., García, H., Fumero, S., Jiménez, C., Alcoceba, M., Chillón, M.C., et al. (2014). Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. *Leukemia* 28, 391–397.
- Putkonen, M., Kairisto, V., Juvonen, V., Pelliniemi, T.-T., Rauhala, A., Itälä-Remes, M., and Remes, K. (2010). Depth of response assessed by quantitative ASO-PCR predicts the outcome after stem cell transplantation in multiple myeloma. *Eur. J. Haematol.* 85, 416–423.

Pyne, S., Hu, X., Wang, K., Rossin, E., Lin, T.-I., Maier, L.M., Baecher-Allan, C., McLachlan, G.J., Tamayo, P., Hafler, D.A., et al. (2009). Automated high-dimensional flow cytometric data analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8519–8524.

Q

Qian, Y., Wei, C., Eun-Hyung Lee, F., Campbell, J., Halliley, J., Lee, J.A., Cai, J., Kong, Y.M., Sadat, E., Thomson, E., et al. (2010). Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. *Cytometry B Clin. Cytom.* 78 Suppl 1, S69-82.

Quadros, E.V., and Sequeira, J.M. (2013). Cellular Uptake of Cobalamin: Transcobalamin and the TCbIR/CD320 Receptor. *Biochimie* 95, 1008–1018.

Quadros, E.V., Nakayama, Y., and Sequeira, J.M. (2013). Saporin Conjugated Monoclonal Antibody to the Transcobalamin Receptor TCbIR/CD320 Is Effective in Targeting and Destroying Cancer Cells. *J. Cancer Ther.* 4, 1074–1081.

R

Raab, M.S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. (2009). Multiple myeloma. *Lancet* 374, 324–339.

Raja, K.R.M., Kovarova, L., and Hajek, R. (2010). Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *Br. J. Haematol.* 149, 334–351.

Rajkumar, S.V. (2015). Evolving diagnostic criteria for multiple myeloma. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2015, 272–278.

Rajkumar, S.V., Hayman, S.R., Lacy, M.Q., Dispenzieri, A., Geyer, S.M., Kabat, B., Zeldenrust, S.R., Kumar, S., Greipp, P.R., Fonseca, R., et al. (2005a). Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood* 106, 4050–4053.

Rajkumar, S.V., Kyle, R.A., Therneau, T.M., Melton, L.J., Bradwell, A.R., Clark, R.J., Larson, D.R., Plevak, M.F., Dispenzieri, A., and Katzmann, J.A. (2005b). Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 106, 812–817.

Rajkumar, S.V., Harousseau, J.-L., Durie, B., Anderson, K.C., Dimopoulos, M., Kyle, R., Blade, J., Richardson, P., Orłowski, R., Siegel, D., et al. (2011). Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. *Blood* 117, 4691–4695.

Rawstron, A.C., Davies, F.E., DasGupta, R., Ashcroft, A.J., Patmore, R., Drayson, M.T., Owen, R.G., Jack, A.S., Child, J.A., and Morgan, G.J. (2002). Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic plasma cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 100, 3095–3100.

Rawstron, A.C., Laycock-Brown, G., Hale, G., Davies, F.E., Morgan, G.J., Child, J.A., Hillmen, P., and Owen, R.G. (2006). CD52 expression patterns in myeloma and the applicability of alemtuzumab therapy. *Haematologica* 91, 1577–1578.

Rawstron, A.C., Orfao, A., Beksac, M., Bezdickova, L., Brooimans, R.A., Bumbea, H., Dalva, K., Fuhler, G., Gratama, J., Hose, D., et al. (2008). Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 93, 431–438.

Rawstron, A.C., Child, J.A., de Tute, R.M., Davies, F.E., Gregory, W.M., Bell, S.E., Szubert, A.J., Navarro-Coy, N., Drayson, M.T., Feyler, S., et al. (2013). Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 2540–2547.

Rawstron, A.C., Gregory, W.M., de Tute, R.M., Davies, F.E., Bell, S.E., Drayson, M.T., Cook, G., Jackson, G.H., Morgan, G.J., Child, J.A., et al. (2015). Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. *Blood* 125, 1932–1935.

Reid, S., Yang, S., Brown, R., Kabani, K., Aklilu, E., Ho, P.J., Woodland, N., and Joshua, D. (2010). Characterisation and relevance of CD138-negative plasma cells in plasma cell myeloma. *Int. J. Lab. Hematol.* 32, e190-196.

Reithmeier, R.A.F., Casey, J.R., Kalli, A.C., Sansom, M.S.P., Alguel, Y., and Iwata, S. (2016). Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 1507–1532.

Rème, T., Hose, D., Theillet, C., and Klein, B. (2013a). Modeling risk stratification in human cancer. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 1149–1157.

- Rème, T., Hose, D., Theillet, C., and Klein, B. (2013b). Modeling risk stratification in human cancer. *Bioinformatics* 29, 1149–1157.
- Rendtlew Danielsen, J.M., Knudsen, L.M., Dahl, I.M., Lodahl, M., and Rasmussen, T. (2007). Dysregulation of CD47 and the ligands thrombospondin 1 and 2 in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 138, 756–760.
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43, e47.
- Robillard, N., Pellat-Deceunynck, C., and Bataille, R. (2005). Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood* 105, 4845–4848.
- Robillard, N., Béné, M.C., Moreau, P., and Wuillème, S. (2013a). A single-tube multiparameter seven-colour flow cytometry strategy for the detection of malignant plasma cells in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 3, e134.
- Robillard, N., Béné, M.C., Moreau, P., and Wuillème, S. (2013b). A single-tube multiparameter seven-colour flow cytometry strategy for the detection of malignant plasma cells in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 3, e134.
- Robillard, N., Wuillème, S., Moreau, P., and Béné, M.C. (2014). Immunophenotype of Normal and Myelomatous Plasma-Cell Subsets. *Front. Immunol.* 5.
- Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T.H., Karasuyama, H., and Melchers, F. (1994). IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int. Immunol.* 6, 1257–1264.
- Romero-Ramírez, H., Morales-Guadarrama, M.T., Pelayo, R., López-Santiago, R., and Santos-Argumedo, L. (2015). CD38 expression in early B-cell precursors contributes to extracellular signal-regulated kinase-mediated apoptosis. *Immunology* 144, 271–281.
- Rongeat, N. (2011). Utilisation de sources polychromes pour le diagnostic cytologique : application à l'hématologie (Limoges).
- Rousseeuw, P.J., Trauwaert, E., and Kaufman, L. (1995). Fuzzy clustering with high contrast. *J. Comput. Appl. Math.* 64, 81–90.

S

Saeed, A.I., Bhagabati, N.K., Braisted, J.C., Liang, W., Sharov, V., Howe, E.A., Li, J., Thiagarajan, M., White, J.A., and Quackenbush, J. (2006). TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol.* 411, 134–193.

Salama, M.E., Du, S., Efimova, O., Heikal, N.M., Wendlandt, E., Toydemir, R.M., South, S., Perkins, S.L., Hussong, J.W., and Zhan, F. (2015). Neoplastic plasma cell aberrant antigen expression patterns and their association with genetic abnormalities. *Leuk. Lymphoma* 56, 426–433.

San Miguel, J.F., García-Sanz, R., González, M., Moro, M.J., Hernández, J.M., Ortega, F., Borrego, D., Carnero, M., Casanova, F., and Jiménez, R. (1995). A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. *Blood* 85, 448–455.

Sanjurjo, L., Aran, G., Roher, N., Valledor, A.F., and Sarrias, M.-R. (2015). AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease. *J. Leukoc. Biol.* 98, 173–184.

Sarasquete, M.E., García-Sanz, R., González, D., Martínez, J., Mateo, G., Martínez, P., Ribera, J.M., Hernández, J.M., Lahuerta, J.J., Orfão, A., et al. (2005). Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. *Haematologica* 90, 1365–1372.

Sarkar, D., Le Meur, N., and Gentleman, R. (2008). Using flowViz to visualize flow cytometry data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 24, 878–879.

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, 467–470.

Schmidt-Hieber, M., Gutiérrez, M.L., Pérez-Andrés, M., Paiva, B., Rasillo, A., Tabernero, M.D., Sayagués, J.M., Lopez, A., Bárcena, P., Sanchez, M.L., et al. (2013a). Cytogenetic profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a study in highly purified aberrant plasma cells. *Haematologica* 98, 279–287.

Schmidt-Hieber, M., Gutiérrez, M.L., Pérez-Andrés, M., Paiva, B., Rasillo, A., Tabernero, M.D., Sayagués, J.M., Lopez, A., Bárcena, P., Sanchez, M.L., et al. (2013b). Cytogenetic profiles in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a study in highly purified aberrant plasma cells. *Haematologica* 98, 279–287.

Scholkopf, B., and Smola, A.J. (2001). *Learning with Kernels: Support Vector Machines, Regularization, Optimization, and Beyond* (Cambridge, MA, USA: MIT Press).

Schreier, S., Malheiros, S.V., and de Paula, E. (2000). Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. *Physicochemical and biological aspects. Biochim. Biophys. Acta* 1508, 210–234.

Seegmiller, A.C., Xu, Y., McKenna, R.W., and Karandikar, N.J. (2007). Immunophenotypic Differentiation Between Neoplastic Plasma Cells in Mature B-Cell Lymphoma vs Plasma Cell Myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* 127, 176–181.

Shah, A. (2015). New developments in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: role of obinutuzumab. *Ther. Clin. Risk Manag.* 11, 1113–1122.

Shaughnessy, J.D., Zhan, F., Burington, B.E., Huang, Y., Colla, S., Hanamura, I., Stewart, J.P., Kordsmeier, B., Randolph, C., Williams, D.R., 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, 2276–2284.

Silvennoinen, R., Lundan, T., Kairisto, V., Pelliniemi, T.-T., Putkonen, M., Anttila, P., Huotari, V., Mäntymaa, P., Siitonen, S., Uotila, L., et al. (2014). Comparative analysis of minimal residual disease detection by multiparameter flow cytometry and enhanced ASO RQ-PCR in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 4, e250.

Singh, S., and Kumar, A. (2009). Leukocyte depletion for safe blood transfusion. *Biotechnol. J.* 4, 1140–1151.

Smith, B.L., Preston, G.M., Spring, F.A., Anstee, D.J., and Agre, P. (1994). Human red cell aquaporin CHIP. I. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens. *J. Clin. Invest.* 94, 1043–1049.

Sondergeld, P., van de Donk, N.W.C.J., Richardson, P.G., and Plesner, T. (2015). Monoclonal antibodies in myeloma. *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO* 13, 599–609.

Sonoki, T., Harder, L., Horsman, D.E., Karran, L., Taniguchi, I., Willis, T.G., Gesk, S., Steinemann, D., Zucca, E., Schlegelberger, B., et al. (2001). Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies. *Blood* 98, 2837–2844.

Sosa, J.M., Nielsen, N.D., Vignes, S.M., Chen, T.G., and Shevkoplyas, S.S. (2014). The relationship between red blood cell deformability metrics and perfusion of an artificial microvascular network. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 57, 291–305.

Soverini, S., Cavo, M., Cellini, C., Terragna, C., Zamagni, E., Ruggeri, D., Testoni, N., Tosi, P., De Vivo, A., Amabile, M., et al. (2003). Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. *Blood* 102, 1588–1594.

Spanoudakis, E., Hu, M., Naresh, K., Terpos, E., Melo, V., Reid, A., Kotsianidis, I., Abdalla, S., Rahemtulla, A., and Karadimitris, A. (2009). Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d. *Blood* 113, 2498–2507.

Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., and Futcher, B. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* 9, 3273–3297.

Stetler-Stevenson, M., Paiva, B., Stoolman, L., Lin, P., Jorgensen, J.L., Orfao, A., Van Dongen, J., and Rawstron, A.C. (2016). Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition. *Cytometry B Clin. Cytom.* 90, 26–30.

Sturn, A., Quackenbush, J., and Trajanoski, Z. (2002). Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 18, 207–208.

Sugár, I.P., and Sealfon, S.C. (2010). Misty Mountain clustering: application to fast unsupervised flow cytometry gating. *BMC Bioinformatics* 11, 502.

Suyarı, E., Sucak, G.T., Akyürek, N., Şahin, S., Baysal, N.A., Yağcı, M., and Haznedar, R. (2013). Tumor-associated macrophages as a prognostic parameter in multiple myeloma. *Ann. Hematol.* 92, 669–677.

T

Tanaka, T., Ichimura, K., Sato, Y., Takata, K., Morito, T., Tamura, M., Kondo, E., Ohara, N., Yanai, H., Sakai, M., et al. (2009). Frequent downregulation or loss of CD79a expression in plasma cell myelomas: potential clue for diagnosis. *Pathol. Int.* 59, 804–808.

- Teitelbaum, A., Ba-Mancini, A., Huang, H., and Henk, H.J. (2013). Health Care Costs and Resource Utilization, Including Patient Burden, Associated With Novel-Agent-Based Treatment Versus Other Therapies for Multiple Myeloma: Findings Using Real-World Claims Data. *The Oncologist* 18, 37–45.
- Tembhare, P.R., Yuan, C.M., Venzon, D., Braylan, R., Korde, N., Manasanch, E., Zuchlinsky, D., Calvo, K., Kurlander, R., Bhutani, M., et al. (2014). Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. *Leuk. Res.* 38, 371–376.
- Terstappen, L.W., Johnsen, S., Segers-Nolten, I.M., and Loken, M.R. (1990). Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 76, 1739–1747.
- Tessier-Marteau, A., Geneviève, F., Godon, A., Macchi, L., and Zandecki, M. (2010). Automated hematology analysers and spurious counts. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 68, 393–407.
- Tian, E., Sawyer, J., Stephens, O.W., Tytarenko, R., Thanendrarajan, S., Schinke, C., Zangari, M., Rhee, F. van, Davies, F.E., Walker, B.A., et al. (2016). Translocations and Jumping Rearrangements at 8q24 Result in over-Expression of MYC and are Key Drivers of Disease Progression. *Blood* 128, 115–115.
- Tohami, T., Drucker, L., Shapiro, H., Radnay, J., and Lishner, M. (2007). Overexpression of tetraspanins affects multiple myeloma cell survival and invasive potential. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 691–699.
- 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, 5116–5121.
- de Tute, R.M., Jack, A.S., Child, J.A., Morgan, G.J., Owen, R.G., and Rawstron, A.C. (2007). A single-tube six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma. *Leukemia* 21, 2046–2049.
- de Tute, R.M., Rawstron, A.C., Gregory, W.M., Child, J.A., Davies, F.E., Bell, S.E., Cook, G., Szubert, A.J., Drayson, M.T., Jackson, G.H., et al. (2016). Minimal residual disease following autologous stem cell transplant in myeloma: impact on outcome is independent of induction regimen. *Haematologica* 101, e69-71.

V

van der Velden, V.H.J., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J.M. (2003). Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17, 1013–1034.

Verschoor, C.P., Lelic, A., Bramson, J.L., and Bowdish, D.M.E. (2015). An Introduction to Automated Flow Cytometry Gating Tools and Their Implementation. *Front. Immunol.* 6.

Vij, R., Mazumder, A., Klinger, M., O’Dea, D., Paasch, J., Martin, T., Weng, L., Park, J., Fiala, M., Faham, M., et al. (2014). Deep sequencing reveals myeloma cells in peripheral blood in majority of multiple myeloma patients. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 14, 131–139.e1.

Vives-Rego, J., Lebaron, P., and Caron, G.N. (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 429–448.

de Vries, A.J., Gu, Y.J., Post, W.J., Vos, P., Stokroos, I., Lip, H., and van Oeveren, W. (2003). Leucocyte depletion during cardiac surgery: a comparison of different filtration strategies. *Perfusion* 18, 31–38.

W

Wagner, S., Myrup, A., and Celluzzi, C. (2006). Method for enriching adherent monocyte populations.

Walker, B.A., Boyle, E.M., Wardell, C.P., Murison, A., Begum, D.B., Dahir, N.M., Proszek, P.Z., Johnson, D.C., Kaiser, M.F., Melchor, L., et al. (2015). Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 3911–3920.

Wang, J., Nygaard, V., Smith-Sørensen, B., Hovig, E., and Myklebost, O. (2002). MArray: analysing single, replicated or reversed microarray experiments. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 18, 1139–1140.

Wang, Y., Inger, M., Jiang, H., Tenenbaum, H., and Glogauer, M. (2013). CD109 plays a role in osteoclastogenesis. *PLoS One* 8, e61213.

Wilkins, M.F., Hardy, S.A., Boddy, L., and Morris, C.W. (2001). Comparison of five clustering algorithms to classify phytoplankton from flow cytometry data. *Cytometry* 44, 210–217.

Williams, E.L., Tutt, A.L., Beers, S.A., French, R.R., Chan, C.H.T., Cox, K.L., Roghanian, A., Penfold, C.A., Butts, C.L., Boross, P., et al. (2013). Immunotherapy targeting inhibitory Fcγ receptor IIB (CD32b) in

the mouse is limited by monoclonal antibody consumption and receptor internalization. *J. Immunol.* Baltim. Md 1950 191, 4130–4140.

Williamson, L.M. (2000). Leucocyte Depletion Of The Blood Supply – How Will Patients Benefit? *Br. J. Haematol.* 110, 256–272.

X

Xiang, Z., Cutler, A.J., Brownlie, R.J., Fairfax, K., Lawlor, K.E., Severinson, E., Walker, E.U., Manz, R.A., Tarlinton, D.M., and Smith, K.G.C. (2007). FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat. Immunol.* 8, 419–429.

Y

Yakoub-Agha, I., Attal, M., Dumontet, C., Delannoy, V., Moreau, P., Berthou, C., Lamy, T., Grosbois, B., Dauriac, C., Dorvaux, V., et al. (2002). Thalidomide in patients with advanced multiple myeloma: a study of 83 patients--report of the Intergroupe Francophone du Myélome (IFM). *Hematol. J. Off. J. Eur. Haematol. Assoc. EHA* 3, 185–192.

Yawata, Y. (2003). Composition of Normal Red Cell Membranes. In *Cell Membrane*, (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 27–46.

You, T., Hu, W., Ge, X., Shen, J., and Qin, X. (2011). Application of a novel inhibitor of human CD59 for the enhancement of complement-dependent cytotoxicity on cancer cells. *Cell. Mol. Immunol.* 8, 157–163.

Yu, L., Warner, P., Warner, B., Recktenwald, D., Yamanishi, D., Guia, A., and Ghetti, A. (2011). Whole blood leukocytes isolation with microfabricated filter for cell analysis. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 79, 1009–1015.

Yusa, S., Ohnishi, S., Onodera, T., and Miyazaki, T. (1999). AIM, a murine apoptosis inhibitory factor, induces strong and sustained growth inhibition of B lymphocytes in combination with TGF-β1. *Eur. J. Immunol.* 29, 1086–1093.

Z

Zagouri, F., Terpos, E., Kastiris, E., and Dimopoulos, M.A. (2016). Emerging antibodies for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 21, 225–237.

Zare, H., Shooshtari, P., Gupta, A., and Brinkman, R.R. (2010). Data reduction for spectral clustering to analyze high throughput flow cytometry data. *BMC Bioinformatics* 11, 403.

Zelnickova, P., Faldyna, M., Stepanova, H., Ondracek, J., and Kovaru, F. (2007). Intracellular cytokine detection by flow cytometry in pigs: Fixation, permeabilization and cell surface staining. *J. Immunol. Methods* 327, 18–29.

Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J.P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B., et al. (2006). The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 108, 2020–2028.

Zheng, X., Abroun, S., Otsuyama, K., Asaoku, H., and Kawano, M.M. (2006). Heterogeneous expression of CD32 and CD32-mediated growth suppression in human myeloma cells. *Haematologica* 91, 920–928.

Zhou, P., Comenzo, R.L., Olshen, A.B., Bonvini, E., Koenig, S., Maslak, P.G., Fleisher, M., Hoffman, J., Jhanwar, S., Young, J.W., et al. (2008). CD32B is highly expressed on clonal plasma cells from patients with systemic light-chain amyloidosis and provides a target for monoclonal antibody–based therapy. *Blood* 111, 3403–3406.

Zhou, Y., Barlogie, B., Shaughnessy, J.D., and Jr (2009). The molecular characterization and clinical management of multiple myeloma in the post-genome era. *Leukemia* 23, 1941.