

Université de Poitiers

Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2019

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE
(décret du 16 janvier 2004)

présentée et soutenue publiquement
le 26 novembre 2019 à Poitiers
par **Madame Cécile Gruchet**

Etude des lymphocytes TCR- $\alpha\beta$ innés au cours de l'évolution
des gammopathies monoclonales

Composition du Jury

Président : Monsieur le Professeur Xavier Leleu

Membres : Monsieur le Professeur Jean-Marc Gombert
Madame le Docteur Emilie Cayssials

Directeur de thèse : Madame le Docteur Stéphanie Guidez



Le Doyen,

Année universitaire 2019 - 2020

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- BOULETI Claire, cardiologie (**absente jusque début mars 2020**)
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRASCA Denis, anesthésiologie-réanimation
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- ISAMBERT Nicolas, cancérologie
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (**en détachement**)
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECLERE Franck, chirurgie plastique, reconstructrice
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- MACCHI Laurent, hématologie
- MCHEIK Jiad, chirurgie infantile
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIoT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie

- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SAULNIER Pierre-Jean, thérapeutique
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- WAGER Michel, neurochirurgie
- XAVIER Jean, pédopsychiatrie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail (**en détachement**)
- BILAN Frédéric, génétique
- BOISSON Matthieu, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- CAYSSIALS Emilie, hématologie
- COUDROY Rémy, réanimation
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DIAZ Véronique, physiologie
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- GARCIA Magali, bactériologie-virologie
- JAVAUGUE Vincent, néphrologie
- KERFORNE Thomas, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- MARTIN Mickaël, médecine interne
- PALAZZO Paola, neurologie
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie
- SAPANET Michel, médecine légale
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités

- PELLERIN Luc, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- BINDER Philippe

Professeurs associés de médecine générale

- BIRAULT François
- FRECHE Bernard
- MIGNOT Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VALETTE Thierry
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Pascal
- ARCHAMBAULT Pierrick
- BRABANT Yann

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié

Professeurs émérites

- ALLAL Joseph, thérapeutique (08/2020)
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie (08/2020)
- CARRETIER Michel, chirurgie générale (08/2021)
- DORE Bertrand, urologie (08/2020)
- GIL Roger, neurologie (08/2020)
- GOMES DA CUNHA José, médecine générale (08/2021)
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (08/2020)
- HERPIN Daniel, cardiologie (08/2020)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (16/02/2021)
- MARECHAUD Richard, médecine interne (24/11/2020)
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (08/2021)
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire (08/2020)
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (08/2020)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2021)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie
- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONToux Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, oncologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- EUGENE Michel, physiologie (ex-émérite)
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (ex-émérite)
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (ex-émérite)
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- POURRAT Olivier, médecine interne (ex-émérite)
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- TOURANI Jean-Marc, oncologie
- VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale

Remerciements

A Monsieur le Professeur Leleu, merci d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Merci également de m'avoir supportée tout au long de mon internat, de m'avoir fait confiance et de m'avoir poussée à faire toujours plus. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect et de ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Gombert, merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, de m'avoir confié ce travail et de m'avoir accompagnée tout au long de sa réalisation. Veuillez trouver dans ce travail mon entière reconnaissance.

A Madame le Docteur Cayssials,

Emilie, je sais combien le myélome te passionne et je te remercie d'autant plus d'avoir bien voulu juger ce travail de thèse. Merci de m'avoir si bien accueillie lors de mes débuts au secteur protégé et de m'avoir ensuite toujours épaulée. Merci aussi pour ta franchise, tes conseils au et en dehors du travail et pour toutes nos discussions « potins ». J'espère que tu seras fière de cette thèse.

A Madame le Docteur Guidez,

Stéphanie, merci milles fois d'avoir accepté d'encadrer ce travail et de m'avoir si bien accompagnée tout au long de ce chemin de croix. Plus largement, merci pour ton soutien et tes conseils tout au long de mon internat. Travailler à tes côtés a toujours été un plaisir et une source d'inspiration. Merci de supporter mes « youhouuuu » et mes concerts de Céline Dion lors des soirées PIF. Merci pour notre amitié au travail mais surtout en dehors du travail (bière/sushi ce soir ?). J'espère que nos chemins continueront dans la même direction.

A la grande famille de l'hématologie poitevine,

Aux chefs qui m'ont accompagnée sur ce long chemin :

Pilar et José, vous avez été mes premiers chefs, merci pour votre patience quand je faisais des boulettes et pour toutes les bières qu'on aura bues ensemble. A quand la prochaine ? Roule ma poule !!

Queen Tomo, travailler avec toi est une chance. Merci pour nos conversations entre filles, pour tes conseils de « maman », pour ton lit, ta table à langer et tes légumes et enfin merci d'être la recordwomen du mètre de shooter de Poitiers.

Vincent, merci pour ta bonne humeur, tes blagues pourries qui nous font bien rire en RCP, ton pif légendaire et pour le trocart à prostate.

Natacha, merci de m'avoir encadrée avec bienveillance lors de mon semestre en greffe. Ton investissement et ton humanité sont un exemple pour moi.

Brigitte, merci de m'avoir encadrée avec patience lors de mes premières consultations.

A mes co-internes devenus grands : Niels et sa coupe de cheveux, Thomas, Antoine et surtout ma petite Débo des îles : merci d'avoir été ma maman de l'hématologie quand je n'étais qu'un bébé sorti de cardio et merci pour tes conseils « gestion de bébé ».

A mes co-internes, pour votre bonne humeur et pour l'amitié qui nous lie :

Florence, mon binôme de promo. De co-interne, nous sommes devenues amies. Merci pour toutes ces heures passées à refaire le monde. Grâce à toi je vis ma meilleure vie au boulot !!

Anthony (#anthonyfoot90@hotmail.fr), la force tranquille. Garde toujours ta bonne humeur mais change d'adresse mail.

Bobinos, mon Padawan, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Puisse ta mèche légendaire continuer de briller dans le PRC.

Hélène, merci pour ton soutien de chaque instant et encore bravo pour le record de longévité en hémato.

Laly, j'espère pouvoir travailler très bientôt avec toi. Embrasse Matt Pokora pour moi.

Aux infirmières, aides-soignantes et ASH du service, merci pour votre bienveillance tout au long de mon internat. Chaque jour vous me faites aimer davantage ce service

Merci en particulier à Soso, ma maman d'HDS, Nathalie, Laurie, Evelyne, Coco, Laura, Lucile, Lucie, Julien, Jérôme, Claire, Cindy, Astrid, Julie, Cécile, Carine, Vanessa, Claire, Emilie, Angélique, Sarah, Anne Charlotte, Ludivine et toutes celles et ceux que j'ai oubliés.

A l'équipe du laboratoire IRTOMIT de l'INSERM U1082 : Aurélie, Alice, Nathalie, Lucie, Lauren, André et Stecy. Merci de m'avoir accueillie pendant mon année de master 2 et d'avoir, de prêt ou de loin, participé à ce travail.

A mes co-internes d'autres horizons,

Thérèse bien sûr, mon binôme de choc (#onestunefamille). Ce semestre avec toi aura été mémorable. Merci d'être la personne que tu es : toujours de bonne humeur avec un zeste de folie. Maître Gims et Céline Dion n'ont qu'à bien se tenir.

Marion, tu as mis des paillettes dans ma vie durant mon année de master 2. Nos pauses café-potins me manquent déjà.

Valoche ma brioche, je n'oublie pas notre semestre en HDJ, nos sandwichs au relais H, nos soirées fiches RCP et nos after dans les bars poitevins. J'arrive te voir bientôt à Nice.

Paul d'Albi, j'espère que tu t'épanouiras en onco ; ce qui est certain c'est que tu manqueras à l'hémato. N'oublie pas de ramener la coupe à la maison.

A la team réa de Saintes : Rub's, Prat et Guigui : on en aura pris des apéros sur ce balcon.

Et à tous les autres : Manon, Anna, Magalie, Audrey, Mattieu, François, Pauline, Margaux, Benoit, Karine, Fanny, Yannick ... et tous ceux que j'ai oubliés.

A mes amis,

Amélie, merci pour ton amitié infaillible. Le temps a filé depuis nos premières soirées Rochelaises. De copine de soirées nous sommes devenues de véritables amies et je mesure la chance que j'ai de t'avoir dans ma vie.

Anaïs, ma petite Peran, ton amitié m'est précieuse et j'espère te compter dans ma vie encore longtemps.

Christophe, que de chemin parcouru depuis les bancs du lycée St François. On aura tout vécu ensemble : le bac, la P1, l'externat et l'internat. J'espère que cela continuera au-delà.

Julien, tantôt CCA, tantôt pilote de chasse. J'espère qu'un jour tu nous feras une nouvelle place dans ta vie. Tu auras toujours une place dans la nôtre.

Arnaud et Maelle, amoureux du Poppy. Merci pour votre joie de vivre communicative.

Aux copains de Poitiers, pour ces innombrables soirées au WC :

Flo et Laura, mes baby-sitter de choc et voisins hors pairs, votre amour du gin est communicatif (peut être trop ?)

Camille et Greg, il aura fallu se retrouver à Poitiers pour enfin se connaître et s'apprécier. On arrive très bientôt vous voir dans la maison papillon.

Raphael et Maeva, avec qui tout a mal commencé et bien fini. Hâte d'être à votre mariage !

Audrey, PM et bébé Jules, vivement le prochain brunch quatre étoiles !

Et à tous les autres : Caupenne, Marie-Lucile, Agathe alias Gra-gratte, Barnabé, Caroline, Aymeric, Céline, Alexis, Pierre...

Aux amis d'ailleurs : Laurine (ma Zerkette, comme j'aimerais te voir plus souvent), Quentin, bébé Luce, Juju (ta folie me manque), Borouch et Sonia (à quand la prochaine soirée à Royan ?), D-Beauv la reine des caves (déso pas déso).

A Harry, Ron et Hermione qui m'ont souvent accompagnée au cours de mes études...

A ma famille,

Aux familles Gruchet, Bordes et Bardet. A la famille Chanemougane. Merci d'avoir pris soin de la petite fille que j'étais ; j'espère vous rendre fiers.

A ma grand-mère qui de là-haut m'a sûrement donné l'envie d'être hématologue.

A la team Merouze : Marie-Christine, Bertrand, Chloé, Clément, Victor et Diane, merci de m'avoir accompagnée pendant ces longues études.

A mon frère Matthieu qui me rappelle souvent qu'il existe une vie en dehors de l'hôpital et qu'il faut savoir en profiter. A Claire, ma belle-sœur depuis si longtemps.

A mes parents, Marie et Renaud que j'aime profondément. Merci de m'avoir accompagnée et soutenue dans ce sacerdoce qu'est la médecine. Merci de m'avoir épaulée avec amour et confiance dans les moments de doute au travail comme dans ma vie en général. Ce travail est aussi le vôtre. Je vous aime.

Enfin et surtout, à mon mari Martin : que de chemin parcouru depuis que ma route a croisé la tienne derrière un poteau de célèbres caves parisiennes... Merci pour ton amour au quotidien et ton soutien sans faille. Je t'aime.

Bien évidemment, à mon petit Simon, ma boule d'amour et d'énergie. Rien de me rend plus fier que toi.

A tous ceux que j'ai oublié et qui ont participé à cette belle aventure ...

Table des matières

LISTES DES ABREVIATIONS	2
INTRODUCTION	4
1. Gammopathie monoclonale et myélome multiple	4
1.1 Définition.....	4
1.2 Épidémiologie.....	5
1.3 Facteurs pronostiques	6
1.4 Indication de traitement.....	6
1.5 Evaluation de la réponse au traitement.....	7
1.6 Traitement : principes généraux et place de l'immunothérapie	7
2. Immunologie et myélome multiple	9
2.1 Rappel d'immunologie générale.....	9
2.2 Immunosubversion dans le myélome multiple	11
3. Lymphocytes T innés	12
3.1 Lymphocytes iNKT.....	12
3.2 Lymphocytes T CD8+ innés	13
3.3 Axe iNKT et Lymphocytes T CD8+ innés dans la leucémie myéloïde chronique	14
OBJECTIF & HYPOTHESE	15
MATERIEL & METHODE	16
1. Cohorte d'étude	16
2. Préparation des prélèvements sanguins	16
3. Culture cellulaire et stimulation IL-12 / IL-18.....	17
4. Immunomarquage	17
5. Cytométrie en flux	18
6. Analyse statistique	19
RESULTATS	20
1. Description de la cohorte.....	20
2. Lymphocytes iNKT	23
2.1 Fréquence des lymphocytes iNKT	23
2.2 Compartimentation CD4/CD8 des lymphocytes iNKT	24
2.3 Expression de CD161 par les lymphocytes iNKT	25
2.4 Expression de PLZF par les lymphocytes iNKT	26
3. Lymphocytes T CD8+ innés.....	27
3.1 Fréquence des LT CD8+ innés.....	27
3.2 Phénotype mémoire EMRA des LT CD8+ innés.....	28
3.3 Activation et fonctionnalité des LT CD8+ innés et des LT CD8+ mémoires	31
4. Impact des données cliniques sur les LT innés.....	33
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	34
BIBLIOGRAPHIE	39
ANNEXES	42
RESUME	45
SERMENT	46

LISTES DES ABREVIATIONS

ASCT : autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (*autologous stem cell transplantation*)

BCMA : *B-cell maturation antigen*

BiTE : anticorps bispécifique (*bispecific T-cells engager*)

CAR-T cells : *chimeric antigen receptor T-cells*

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMN : cellules mononucléées

CRAB : *calcium, renal failure, anemia, bone lesions*

CTLA-4 : *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

Del17p : délétion 17p

DN : double négatif

DP : double positif

DFG : débit de filtration glomérulaire

DS : donneurs sains

EMD : *extramedullary disease*

EMRA : *effector Memory CD45RA+*

Eomes : *eomesodermin*

Ig : immunoglobulines

IL : interleukine

IM : *innate memory*

IMWG : *international myeloma working group*

iNKT : *invariant natural killer lymphocyte T*

ISS : *international Staging System*

KIR : *killer cell immunoglobulin-like receptor*

LDH : lactate déshydrogénase

LMC : leucémie myéloïde chronique

LT : lymphocytes T

MGUS : gammopathie monoclonale de signification indéterminée (*monoclonal gammopathy of undetermined signifiante*)

MM : myélome multiple

MRD : maladie résiduelle minimale (*minimal residual disease*)

NDMM : nouveau diagnostic de myélome multiple

NGS : séquençage haut débit (*next generation sequencing*)
NK : *natural killer*
OS : *overall survival*
PD-1 : *programmed-death-1*
PD-L1 : *programmed-death-ligand-1*
PFS : survie sans progression (*progression free survival*)
PLZF : *promyelocytic leukemia zinc finger*
RC : réponse complète
R-ISS : *revised International Staging System*
RP : réponse partielle
RRMM : *relapsed and refractory multiple myeloma*
sFLC : chaînes légères sériques (*serum free-lite chain*)
sMM : myélome indolent (*smoldering multiple myeloma*)
sRC : réponse complète stringente
t(4 ;14) : translocation entre les chromosome 4 et 14
TCM : lymphocyte T central mémoire
TCR : *T-cell receptor*
TEM : lymphocyte T effecteur mémoire
TGF- β : *transforming growth factor β*
TIM-3 : *T-cell immunoglobulin and mucin domain 3*
VEGF : vascular endothelial growth factor
VGPR : très bonne réponse partielle (*very good partial response*)

INTRODUCTION

1. Gammopathie monoclonale et myélome multiple

1.1 Définition

Les gammopathies monoclonales regroupent plusieurs entités caractérisées par la prolifération clonale de plasmocytes tumoraux au niveau médullaire. Pour rappel, les plasmocytes sont des lymphocytes B matures présents essentiellement dans les tissus, en particulier dans la moelle osseuse, et dont la fonction principale est la production d'anticorps en réponse à des antigènes du non-soi.

En cas de gammopathies monoclonales, les plasmocytes transformés sont responsables de la sécrétion massive d'immunoglobulines (Ig) monoclonales. Dans la majorité des cas, cette Ig est dite complète, c'est-à-dire composée de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes d'isotype IgG, IgA ou IgD et 2 chaînes légères (Kappa ou Lambda) (**Figure 1**). L'Ig peut également être composée uniquement de chaînes légères (15 à 20% des cas) ou être non identifiée dans 3% des situations (on parle alors de myélome non sécrétant) (1).

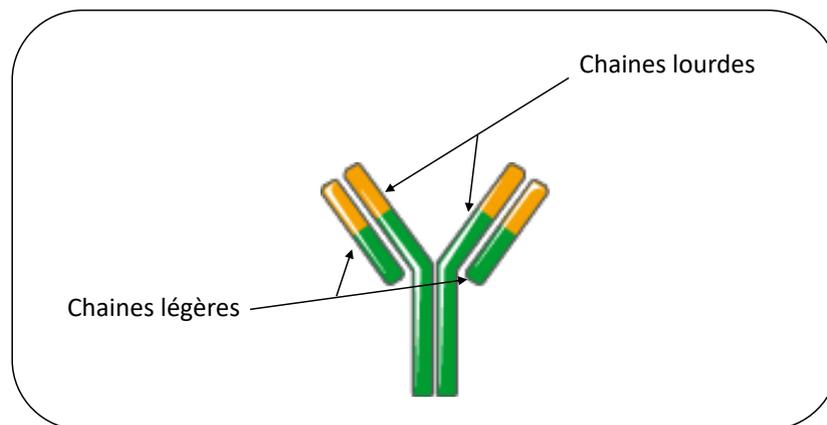


Figure 1. Représentation d'une Ig complète

Au sein des gammopathies monoclonales, il existe un continuum évolutif qui s'étend d'un stade précancéreux, appelé MGUS (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*) jusqu'au stade de cancer actif ou myélome multiple (MM) (**Figure 2**) (2).

En cas de MGUS, les plasmocytes transformés sont caractérisés par l'acquisition de mutations somatiques, en particulier des hyperdiploïdies et des translocations impliquant le gène IgH codant pour les chaînes lourdes des Ig (2).

Le diagnostic de MGUS repose sur la présence d'Ig monoclonale < 30g/L, d'une plasmocytose médullaire < 10% et par l'absence de complication (3).

L'évolution vers le stade de myélome indolent ou sMM (*smoldering multiple myeloma*) résulte d'une instabilité génomique affectant des oncogènes (TP53, MYC, KRAS) et d'un remodelage du microenvironnement (4). Selon l'IMWG (*International Myeloma Working Group*), les sMM sont définis par un taux de plasmocytes médullaires $\geq 10\%$ et $< 60\%$ et/ou par la présence d'un pic monoclonal $\geq 30\text{g/L}$ au niveau sanguin ou $\geq 0,5\text{g/24h}$ au niveau urinaire et par l'absence de critère de traitement. Au sein des sMM, on définit un sous-groupe dit « sMM de haut risque évolutif » caractérisé par un ratio de chaînes légères sériques > 8 et < 100 ou une plasmocytose médullaire $> 50\%$ et $< 60\%$ ou une immunoparésie majeure. Enfin, le MM symptomatique est caractérisé par une plasmocytose médullaire $\geq 10\%$ et par la présence d'au moins un critère de traitement (3).

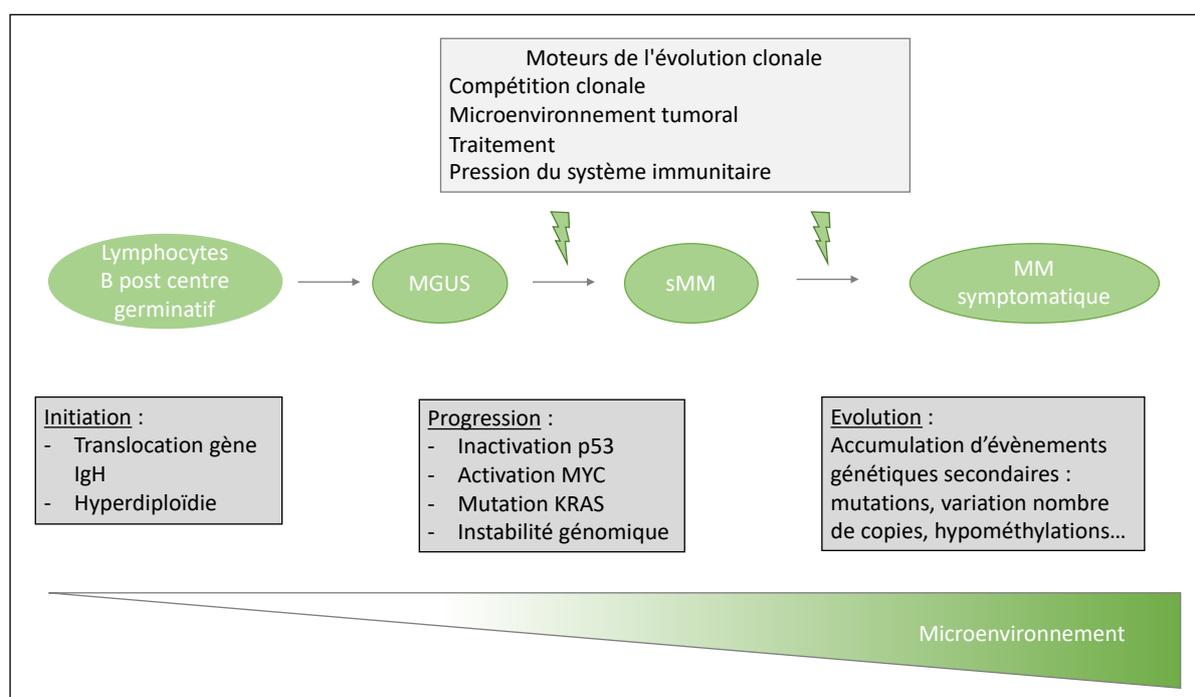


Figure 2. Évolution des gammopathies monoclonales

1.2 Épidémiologie

Au sein de la population générale, la MGUS est une pathologie fréquente qui touche préférentiellement les hommes et les sujets de plus de 50 ans avec une prévalence augmentant régulièrement avec l'âge. En effet, dans une étude menée sur 21 463 donneurs volontaires aux États-Unis, la prévalence des MGUS est de 3,2% chez les plus de 50 ans et de 5,3% chez les plus de 70 ans (5). On estime que le risque d'évolution vers le MM est d'environ 1% par an en cas de MGUS ce qui signifie que la majorité des patients suivis pour MGUS n'évolueront jamais vers le stade cancer (6).

A contrario, le MM est un cancer rare qui ne représente que 1% de l'ensemble des cancers et 10% des hémopathies malignes. Le MM représente la deuxième hémopathie la plus fréquente derrière les lymphomes B malins non hodgkiniens (7). En Europe, l'incidence du MM est d'environ 6 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an avec un âge médian au diagnostic de 66 ans et un sexe ratio Homme/Femme de 1,43 (1). L'isotype le plus fréquent est le MM IgG Kappa qui représente 34% des MM (1).

1.3 Facteurs pronostiques

Différents paramètres sont connus pour influencer péjorativement le pronostic des patients suivis pour un MM :

- Présence de localisation extra-médullaire ou EMD (*Extramedullary disease*)
- Présence de plasmoblastes (plasmocytes immatures avec une importante capacité de prolifération)
- Plasmocytes tumoraux présentant des anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic comme une translocation entre les chromosomes 4 et 14 ou t(4 ;14) et/ou une délétion 17p (del17p) (8).

Afin d'identifier précocement les MM de mauvais pronostic des scores prédictifs ont été développés : il s'agit des score ISS (*International Staging System*) et R-ISS (*Revised International Staging System*).

Le score ISS prend en compte les dosages de la β 2-microglobuline et de l'albumine et permet de classer les MM en 3 catégories : pronostic standard (ISS à 1), intermédiaire (ISS à 2) et défavorable (ISS à 3) (9). Ce score a été révisé en 2015 par l'équipe du Pr Palumbo qui a ajouté au score ISS, le dosage des LDH (lactate déshydrogénase) et les paramètres cytogénétiques (10). Dans cette étude menée sur 4445 MM au diagnostic, un score R-ISS à 3 est associé à une survie globale (OS : *overall survival*) de 40% et une survie sans progression (PFS : *Progression free survival*) de 24% à 5 ans. En comparaison, en cas de score R-ISS à 1, l'OS et la PFS à 5 ans sont respectivement de 82% et de 55%.

Ces deux scores sont détaillés en annexe.

1.4 Indication de traitement

L'infiltration médullaire et la sécrétion massive d'Ig sont responsables de manifestations clinico-biologiques qui imposent de débiter rapidement un traitement et qui sont regroupées sous le nom de critères *CRAB*.

Il s'agit de l'hypercalcémie (calcémie > 2,75mmol/L ou > limite haute des valeurs de référence + 0,25mmol/L), de l'insuffisance rénale (DFG < 40mL/min), de l'anémie

(hémoglobine < 10g/dL ou < limite basse des valeurs de référence - 2g/dL) et de la présence de lésions osseuses ostéolytiques (≥ 1 lésion ostéolytique de plus de 5mm) (3). D'autres manifestations cliniques plus rares peuvent également nécessiter un traitement, comme la présence d'un syndrome d'hyperviscosité ou d'une neuropathie liée à l'Ig monoclonale.

En 2014, l'IMWG a élargi les indications de traitement en définissant les « nouveaux critères CRAB » ou marqueurs de malignité : plasmocytose médullaire $\geq 60\%$, ratio des chaînes légères sériques ≥ 100 et présence de plus d'une lésion osseuse focale en IRM (11) (12) (13).

1.5 Evaluation de la réponse au traitement

L'IMWG a défini des critères permettant d'évaluer la profondeur de la réponse au traitement, facteur prédictif majeur de la PFS (14).

La rémission complète (RC) est définie par la disparition du composant monoclonal au niveau sanguin et urinaire (immunofixation négative) et un taux de plasmocytes médullaires inférieur à 5%. Cette RC est dite stringente (ou sRC) lorsque le ratio des chaînes légères sériques est normalisé et lorsque l'immunophénotypage médullaire est négatif.

Afin de documenter d'avantage la profondeur de la RC, il est nécessaire d'évaluer ce que l'on appelle la maladie résiduelle minimale ou MRD. La MRD peut être évaluée par cytométrie en flux ou par séquençage haut débit (ou NGS : *next generation sequencing*). En cytométrie en flux, la MRD est dite négative lorsqu'on ne détecte plus le phénotype clonal (seuil de sensibilité de 10^{-4} à 10^{-6}). En NGS, on parle de MRD négative en l'absence d'ADN clonal sur le prélèvement médullaire (sensibilité de 10^{-6}).

Dans le MM, l'obtention d'une MRD 10^{-6} négative est une priorité, car elle est associée à une amélioration significative de la PFS. (15)

On définit également la très bonne réponse partielle (VGPR) en cas de diminution de plus de 90% du composant monoclonal et la réponse partielle (RP) en cas de diminution de 50 à 90%. Enfin, la progression correspond à une élévation de l'Ig monoclonale de plus de 25%. Dans les autres situations, on parlera de maladie stable.

1.6 Traitement : principes généraux et place de l'immunothérapie

Actuellement, les recommandations n'autorisent que le traitement des MM symptomatiques, c'est-à-dire associés à au moins un critère CRAB anciens ou nouveaux. En dehors d'essais cliniques, l'abstention thérapeutique est la règle concernant les autres gammopathies monoclonales (MGUS et sMM).

Le traitement du MM repose sur une association de thérapies comprenant dans la majorité des cas un inhibiteur du protéasome (Bortezomib, Carfilzomib, et Ixazomib), un

immunomodulateur (Thalidomide, Lenalidomide et Pomalidomide) et des corticostéroïdes (Dexaméthasone) (16) (17). Chez les sujets jeunes, c'est-à-dire de moins de 70-75 ans, une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (ou ASCT) est associée à ces traitements dès la 1^{ère} ligne (18). Le développement de ces thérapies plus ciblées permet d'une part de s'affranchir progressivement de la chimiothérapie conventionnelle et de ses complications ; et d'autre part d'améliorer les taux et la profondeur de la réponse au traitement.

Dans l'arsenal thérapeutique, l'immunothérapie occupe depuis quelques années une place de choix. En effet, le système immunitaire est capable de détecter et d'éliminer des cellules en transformation selon 3 étapes regroupées sous le terme de théorie des 3E : élimination, équilibre et échappement (19).

A la phase d'élimination, l'inoculum tumoral est complètement ou partiellement éliminé par les cellules du système immunitaire. Puis dans un second temps, le reliquat de cet inoculum tumoral est maintenu dans un état de quiescence ; on parle alors de phase d'équilibre. Enfin, sous la pression du système immunitaire, les cellules de l'inoculum tumoral vont devenir résistantes et vont échapper au contrôle du système immunitaire (phase d'échappement).

Le système immunitaire participe donc largement à la lutte anti-tumorale et de ce fait les immunothérapies sont des armes puissantes en oncohématologie.

Pour preuve, les anticorps monoclonaux anti-CD38 (Daratumumab et Isatuximab) sont actuellement largement utilisés : en première ligne, uniquement dans le cadre d'essais cliniques et ont l'autorisation d'utilisation en pratique courante en cas de MM réfractaire ou en rechute (ou RRMM : *Relapsed and Refractory Multiple Myeloma*). Leur efficacité résulte d'une expression majeure de CD38 par les plasmocytes tumoraux. Dans une étude de phase 3 menée par Palumbo et son équipe sur 498 RRMM, l'association Daratumumab, Bortezomib et Dexaméthasone est associée à un taux de réponse global de 82,9% dont 19,2% RC et une PFS à 12 mois de 60,7% (20). L'Isatuximab, un anticorps ciblant un épitope différent de CD38, a également fait l'objet d'une étude de phase 3 internationale menée sur 307 RRMM (ICARIA-MM). Les premiers résultats de l'association Isatuximab, Pomalidomide et Dexaméthasone, rapportés en février 2019 montrent une médiane de PFS de 11,5 mois et un taux de réponse global de 60,4% dont 31,8% \geq VGPR (21).

D'autres immunothérapies plus sophistiquées telles que les *CAR-T cells* (*Chimeric Antigen Receptor T-cells*) émergent également dans le traitement des RRMM. Pour rappel, les *CAR T cells* sont des lymphocytes T autologues génétiquement modifiés et amplifiés pour exprimer un récepteur T chimérique capable de cibler un antigène tumoral. Dans le cadre du MM, l'antigène tumoral ciblé est BCMA (*B-cell Maturation Antigen*) qui est exprimé à la fois par

les plasmocytes tumoraux et normaux. Les essais *CAR T cells* anti-BCMA conduits sur des RRMM multi-traités (médiane de 7 lignes de traitements antérieurs) donnent des résultats encourageants avec un taux de réponse global de 95% dont 45% de RC et une médiane de PFS de 11,8 mois (22).

Des essais précoces sont également en cours sur l'utilisation d'anticorps bi-spécifiques ou BiTE (*bispecific T-cells engager*) ciblant les antigènes BCMA, exprimés par le plasmocyte tumoral et CD3, exprimés par les LT. Les premiers résultats, publiés en mai 2019 et menés sur 10 RRMM objectivent un taux de réponse global de 70% et 50% de sRC (23).

L'efficacité des immunothérapies dans le MM vient du fait qu'il existe en cas de MM une immunosubversion majeure (24).

2. Immunologie et myélome multiple

2.1 Rappel d'immunologie générale

Le système immunitaire est composé de deux grandes entités : l'immunité innée et l'immunité adaptative qui participent conjointement à la défense contre les antigènes étrangers. L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre le non-soi ; elle est rapide (quelques heures) mais relativement peu spécifique. Les acteurs de l'immunité innée sont principalement les barrières épithéliales, les cellules *Natural Killer* (NK) et les cellules phagocytaires (macrophages et polynucléaires neutrophiles).

L'immunité adaptative intervient plus tardivement (quelques jours) mais constitue une réponse immunitaire plus spécifique, plus ample et donc plus efficace contre les pathogènes. Elle est médiée par les lymphocytes T (ou LT) responsables de la réponse cellulaire et par les lymphocytes B impliqués dans la réponse dite humorale.

Les lymphocytes B, en particulier les plasmocytes, sont responsables de la production d'anticorps en réponse à une infection par un pathogène.

Les LT sont composés des LT CD4⁺ ou auxiliaires et des LT CD8⁺ ou cytotoxiques. Les LT CD4⁺, lorsqu'ils sont activés, permettent le recrutement d'autres effecteurs immunitaires. Ils peuvent ainsi induire 3 types de réponse immunitaire : réponse de type Th1 (ou cytotoxique) *via* l'activation des LT cytotoxiques et des cellules phagocytaires, Th2 (ou allergique) et Th3 (ou régulatrice).

Les LT CD8⁺ sont quant à eux impliqués dans la lyse des cellules infectées ou anormales *via* la libération d'enzymes cytolytiques comme la perforine et les protéines de la famille des granzymes.

L'activation des LT CD4⁺ ou CD8⁺ nécessite 3 signaux distincts qui constituent la synapse immunologique (**Figure 3**) :

- Un signal médié par la liaison entre le récepteur du LT (ou TCR : *T-cell receptor*) et l'antigène du non soi. Ce dernier est présenté aux LT par des cellules présentatrices d'antigène, telles que les cellules dendritiques, par l'intermédiaire de protéines de surface appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité (ou CMH). Les molécules du CMH de type 1 permettent la présentation d'antigène au LT CD8⁺ tandis que celles du CMH de type 2 sont en lien avec les LT CD4⁺.
- Un signal médié par la liaison entre CD28, exprimé par les LT, et les molécules de costimulation CD80/CD86, exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène.
- Un signal médié par les cytokines pro-inflammatoires : Interleukine (IL)-12 et IFN γ qui favorisent une réponse de type Th1 ; et IL-4 qui oriente vers une réponse Th2.

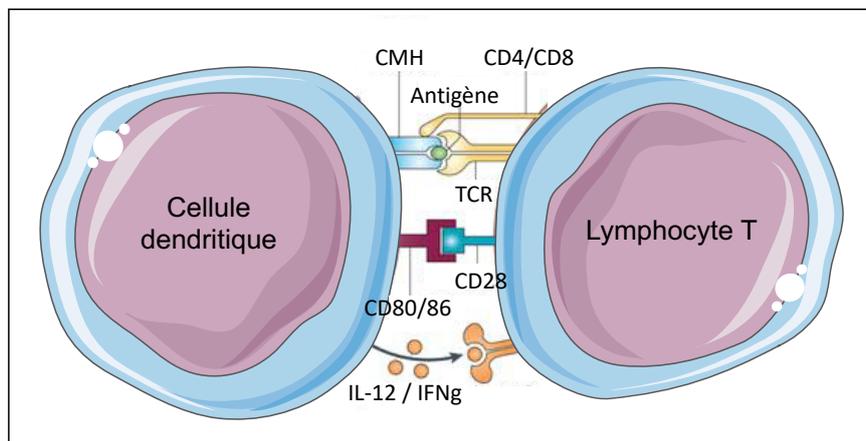


Figure 3. Schéma de la synapse immunologique, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; TCR : T Cell receptor ; IL : interleukine, IFN γ : Interferon- γ

L'activation des LT est suivie d'une anergie ou exhaustion permettant de contrôler le système immunitaire et d'éviter ainsi des réactions d'auto-immunité.

Pour cela, les LT expriment un certain nombre de récepteurs inhibiteurs ou *checkpoint* qui, lorsqu'ils sont activés, entraînent l'apoptose des LT : PD-1 (*program death 1*), CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) ou TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin domain 3*).

2.2 Immunosubversion dans le myélome multiple

Le MM est associé à une dysfonction immunitaire majeure qui touche à la fois les acteurs de l'immunité innée et ceux de l'immunité adaptative (25).

Ainsi, le MM provoque des altérations quantitatives et qualitatives des cellules NK *via* une diminution d'expression des récepteurs activateurs (NKG2D et NKp30) et une surexpression des signaux de mort cellulaire (PD-1) à la surface des cellules NK.

Les cellules dendritiques sont également moins fonctionnelles du fait d'une diminution d'expression des molécules du CMH et des molécules de costimulation (CD80/CD86) et d'une surexpression du ligand de PD-1 (PD-L1).

Le compartiment adaptatif est également impacté par les plasmocytes tumoraux : diminution du nombre de LT CD4+, diminution de la réponse de type Th1, altération des fonctions cytotoxiques des LT CD8+ (*via* la voie PD-1/PD-L1) et défaut de croissance et de différenciation des LT.

Le MM est également associé à une perte d'expression de CD19 par les lymphocytes B, laquelle est responsable d'une hypogammaglobulinémie profonde (26).

En parallèle, les plasmocytes transformés stimulent les cellules immunosuppressives telles que les lymphocytes T et B régulateurs, les cellules myéloïdes immunosuppressives et les macrophages associés aux tumeurs. Ils sont notamment responsables de la sécrétion de cytokines immunosuppressives telle que TGF- β , IL-10, IL-6, VEGF et la prostaglandine E2.

A la frontière entre immunité innée et adaptative, se situe l'immunité dite « naturelle » médiée principalement par des LT non conventionnels. Ces LT possèdent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles communes aux LT, comme l'expression d'un TCR- $\alpha\beta$, et aux cellules NK. Ils sont capables d'activer leurs fonctions effectrices sans l'engagement de leur TCR.

Dans la littérature, il existe très peu de données traitant de l'impact du MM sur ces populations de LT.

3. Lymphocytes T innés

Dans notre projet de recherche, nous nous intéressons à des populations de LT non conventionnels connues pour jouer un rôle clé dans l'immunosurveillance anti-tumorale : les lymphocytes *invariants natural killer* T (lymphocytes iNKT) et les LT CD8⁺ innés.

3.1 Lymphocytes iNKT

L'une des premières sous-populations de LT innés décrite est le lymphocyte iNKT qui exprime un TCR- $\alpha\beta$ dont la chaîne α , issue d'un réarrangement V α 24 chez l'Homme et J α 18 chez la Souris, est invariante. Ce TCR est restreint par la molécule du CMH de classe I non classique CD1d, présente sur les cellules dendritiques, les monocytes et les lymphocytes B (27).

D'un point de vue phénotypique, chez l'Homme, les lymphocytes iNKT sont double-positif (DP) CD4⁺ CD8⁺ ou double-négatifs (DN), autrement dit CD4⁻ et CD8⁻.

Leur caractère inné repose sur l'expression de marqueurs membranaires caractéristiques des cellules NK (CD122, CD16, CD56, CD161, NKG2A et NKG2D) et sur leur capacité à être cytotoxiques sans engagement du TCR. En effet, les lymphocytes iNKT sont capables de produire de l'interféron- γ (IFN γ) en réponse à des *stimuli* innés (stimulation par le couple IL-12 / IL-18). L'IL-15 et le facteur de transcription PLZF (*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*) sont deux éléments moléculaires essentiels dans la différenciation et le maintien des fonctions des lymphocytes iNKT.

De nombreux travaux montrent que les lymphocytes iNKT jouent un rôle primordial dans la défense anti-tumorale *via* différents mécanismes (28):

- Action cytotoxique directe sur les cellules tumorales exprimant CD1d via la production de protéines cytolytiques (Perforine et Granzyme), la sécrétion de TNF- α et l'activation de la voie Fas / Fas-ligand.
- Recrutement des cellules immunitaires effectrices de l'immunité innée (macrophages, cellules NK, cellules dendritiques) et adaptative (lymphocytes B et T)
- Inhibition des cellules immunosuppressives (macrophages associés aux tumeurs, cellules myéloïdes suppressives)

Le plasmocyte transformé, caractéristique des gammopathies monoclonales, exprime CD1d et constitue donc une cible de choix pour les lymphocytes iNKT.

En effet, des travaux menés en 2003 (29) ont mis en évidence un déficit fonctionnel (production d'IFN γ) des lymphocytes iNKT en cas de MM symptomatique par rapport aux

stades plus précoces de la maladie (MGUS ou sMM). Ces résultats laissent présumer que les lymphocytes iNKT jouent un rôle dans le continuum évolutif menant au MM.

3.2 *Lymphocytes T CD8+ innés*

Une autre population de LT a été mise en évidence chez la souris comme jouant un rôle dans l'immunité innée : les lymphocytes T CD8+ « innate memory » (30). Ces cellules ont comme caractéristique de pouvoir sécréter l'IFN γ sans engagement de leur TCR en réponse à des *stimuli* innés. D'un point de vue phénotypique, elles expriment notamment le facteur de transcription Eomesodermin (Eomes) et des récepteurs KIRs (*killer cell immunoglobulin-like receptor*) habituellement exprimés par les cellules NK.

Une population homologue a été identifiée chez l'Homme : les LT CD8+ innés (31). Ces cellules expriment des marqueurs T conventionnels comme CD3, CD8 et un TCR $\alpha\beta$, des marqueurs de cellules NK (CD56, KIRs, NKG2A, NKG2C, CD159a, CD94) et un phénotype mémoire terminal *Effector Memory* CD45RA⁺ ou EMRA (CD45RA⁺ CCR7⁻ CD57⁺) (**Figure 4**). Comme leurs homologues murins, les LT CD8+ innés humains exercent des fonctions cytotoxiques en réponse à des *stimuli* innés.

Dans les cancers solides, les LT CD8+ innés ont été mis en évidence dans les ganglions drainant la tumeur (cancer du sein) ou bien dans la tumeur (cancer de l'ovaire), ce qui suggère un rôle de cette population cellulaire dans la réponse immunitaire anti-tumorale (32).

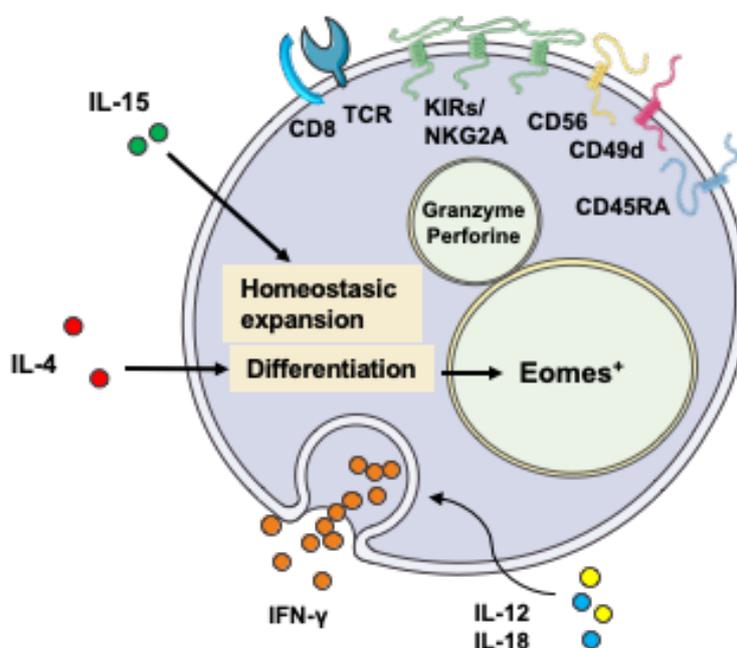


Figure 4. Caractéristiques des LT CD8⁺ innés humains, Barbarin et al, *Frontiers in Immunology* 2017
 IL : interleukine, IFN γ : Interferon- γ ; KIRs : *killer cell immunoglobulin-like receptor* ; Eomes : Eomesodermin ;
 TCR : *T cell receptor*

3.3 Axe iNKT et Lymphocytes T CD8+ innés dans la leucémie myéloïde chronique

Les LT innés ont déjà été étudiés dans une hémopathie maligne : la leucémie myéloïde chronique (LMC). Ces travaux ont mis en évidence un déficit numérique et fonctionnel des LT CD8+ innés chez les patients en phase chronique de LMC (33). Ce déficit en LT CD8+ innés est corrélé à un déficit d'expression de PLZF par les lymphocytes iNKT (**Figure 5**) (32) (33). De manière intéressante, on observe une correction partielle de la diminution des LT CD8+ innés en cas de rémission cytologique complète (33).

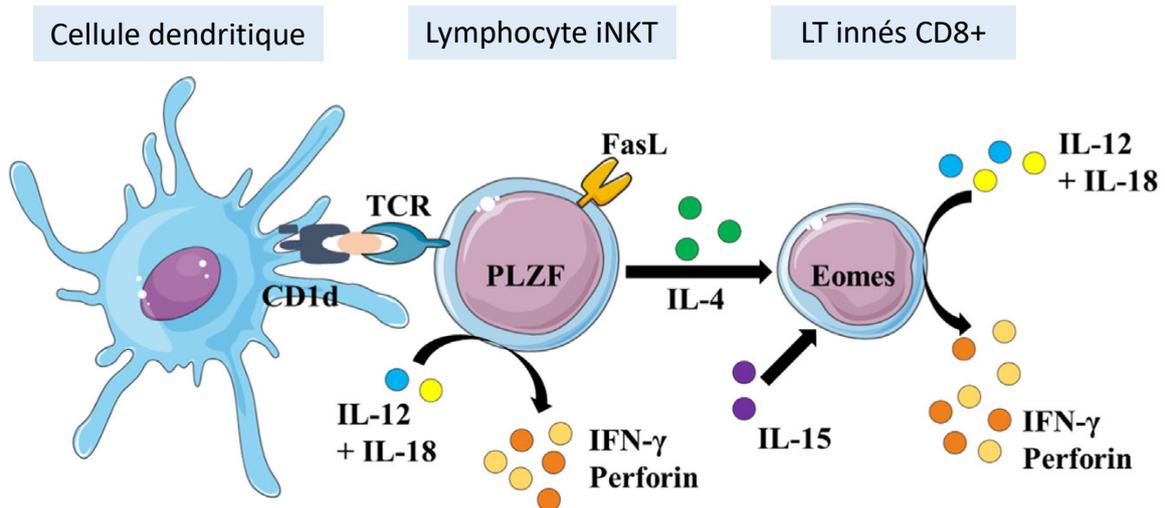


Figure 5. Axe iNKT/ LT CD8+ innés dans la LMC, Barbarin et al, *Frontiers in Immunology* 2017
IL : interleukine, IFN γ : interféron- γ ; Eomes : Eomesodermin ; TCR : T cell receptor ; PLZF : Promyelocytic Leukemia Zinc Finger ; FasL : Fas ligand

OBJECTIF & HYPOTHESE

Les données récentes de la littérature suggèrent donc un rôle clé des lymphocytes iNKT dans l'évolution tumorale des gammopathies monoclonales. En revanche, aucune étude n'a évalué les LT CD8+ innés dans ces hémopathies. Or, nous savons grâce aux travaux menés dans le cadre de la LMC, que les LT CD8+ innés peuvent jouer un rôle crucial dans le contrôle immunologique des hémopathies et qu'il semble exister un lien entre lymphocytes iNKT et LT CD8+ innés (33) .

L'objectif de ce travail est donc de documenter et d'évaluer le rôle des lymphocytes iNKT et des LT CD8+ innés à différents stades de gammopathies monoclonales : MGUS, MM symptomatique nouvellement diagnostiqués, MM en rechute et MM en cours de traitement en réponse complète (RC) par rapport à la population générale (donneurs sains).

Notre hypothèse de travail est qu'il existe une altération quantitative et/ou fonctionnelle des lymphocytes iNKT et des LT CD8+ innés en cas de gammopathies monoclonales. Nous rechercherons également un éventuel lien entre ces deux populations d'intérêt, à l'instar de celui décrit dans la LMC.

Par ailleurs, nous évaluerons l'impact de l'obtention d'une RC sur ces populations lymphocytaires T innées. Notre hypothèse est que l'obtention d'une réponse complète pourrait être associée à une restauration des LT innés.

MATERIEL & METHODE

1. Cohorte d'étude

Pour réaliser ce projet nous avons travaillé sur une cohorte de patients atteints de gammopathie monoclonale et de donneurs sains (DS).

Les échantillons sanguins des 18 DS proviennent de l'établissement français du sang de Lyon et ceux des patients ont été prélevés dans les services d'Hématologie et Thérapie Cellulaire et de Rhumatologie du CHU de Poitiers. Les patients ont tous signé un consentement éclairé ; le protocole a été approuvé par le comité d'éthique du Poitou-Charentes.

La cohorte est composée de 33 patients : 9 MGUS, 8 MM symptomatiques nouvellement diagnostiqués (NDMM), 8 MM en rechute et 8 patients en RC (**Tableau 1**).

Sous-groupe	Effectif	Moyenne d'âge (min – max)
MGUS	9	58 ans (41 – 70)
Nouveau diagnostic de MM symptomatique ou NDMM	8	67,4 ans (48 – 82)
MM en rechute	8	71,9 ans (62 – 82)
RC	8	66,7 ans (54 – 90)
Donneurs sains (DS)	18	49,4 ans (27 – 63)

Tableau 1. Description de la cohorte.

2. Préparation des prélèvements sanguins

Les cellules mononucléées (CMN) ont été isolées à partir du sang veineux par gradient de densité sur Ficoll (PAA Laboratoire GmbH), lavées, énumérées et congelées dans du RPMI-1640 GlutaMAX TM-I (Life Technologies) supplémenté de 50% de serum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Life Technologies) et 10% de DMSO (Diméthylsulfoxyde Sigma). Les CMN (8 à 15 millions par cryotube) sont ensuite conservées au congélateur à -80°C.

Après décongélation et deux lavages en RPMIc (RPMI-1640 supplémenté par 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine (Life Technologies) et 10% de SVF), les cellules sont numérées dans un compteur automatique de cellules (Countess II FL, Life Technologies) après ajout de bleu de trypan 0,4% (dilution au 1/2) permettant de colorer les cellules mortes.

Ensuite, les cellules sont remises en suspension dans une solution de tampon de marquage (PBS 1X, 2% SVF, 2mM EDTA) à une concentration de $10 \cdot 10^6$ cellules par ml et transférées dans une plaque 96 puits à raison de $1 \cdot 10^6$ cellules par puits.

Pour chaque expérience, les cellules des patients ont été analysées simultanément avec celles d'un donneur sain.

3. Culture cellulaire et stimulation IL-12 / IL-18

Afin d'évaluer la fonctionnalité des LT CD8 innés, les CMN sont mises en culture en présence d'IL-12 et d'IL-18.

Pour cela, les CMN des DS et des patients sont déposées à $1 \cdot 10^6$ cellules par ml et par puits en plaque de 24 puits. Puis, les cellules sont incubées pendant 48 heures en présence d'IL-12 (20ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, États-Unis) et d'IL-18 (20ng/ml, MBL International, Woburn, États-Unis).

Cinq heures avant la fin de la culture cellulaire, le Golgistop (BD Biosciences, Franklin Lakes, États-Unis) est ajouté dans chaque puits afin de bloquer le transport intracellulaire d'IFN γ , lequel va ainsi s'accumuler dans l'appareil de Golgi.

Pour chaque patient ou DS analysé, sont réalisés, en parallèle, des puits stimulés et des puits non stimulés.

4. Immunomarquage

L'analyse des CMN a été effectuée *ex vivo* ou après culture cellulaire par cytométrie en flux après la réalisation de marquages membranaires et intracellulaires.

Les anticorps utilisés pour identifier nos populations cellulaires et les différents panels réalisés sont détaillés en annexe.

Dans un premier temps, après deux lavages en PBS, les cellules sont incubées avec un marqueur de viabilité pendant 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante afin d'exclure les cellules mortes (Zombie NIRTM Fixable Viability Kit, BioLegend).

Après deux lavages en tampon de marquage, les cellules sont incubées à 4°C et à l'obscurité dans 50 μ L de tampon de marquage contenant l'anticorps anti-TCR V α 24-J α 18 (6B11). L'objectif de ce premier marquage membranaire est d'éviter l'encombrement stérique au niveau du complexe TCR.

Nous réalisons ensuite un deuxième marquage membranaire, dans les mêmes conditions, avec les autres marqueurs membranaires et selon le panel d'intérêt. Après deux lavages en tampon de marquage, les cellules sont fixées et perméabilisées avec le kit de marquage anti-Foxp3 (eBioscience) pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Enfin, suite à la perméabilisation nucléaire, les cellules sont lavées puis incubées pendant 30 minutes à 4°C et à l'obscurité dans 50µL de tampon de perméabilisation contenant les anticorps intracellulaires adéquats (Eomes, Perforine, IFN γ , PLZF).

Les cellules sont ensuite conservées en tampon de fixation (PBS, 2,5% de paraformaldéhyde (VWR international), 2mM EDTA), transférées en tubes FACS (BD Biosciences) et conservées à l'abri de la lumière à 4°C jusqu'au passage au cytomètre.

5. Cytométrie en flux

Les acquisitions sont réalisées sur un cytomètre en flux 10 paramètres FACSVerse™ (BD Biosciences®), de la plateforme ImageUp de Poitiers et les données sont enregistrées grâce au logiciel FacsSuite™ (BD Biosciences®).

Les données récoltées sont ensuite analysées à l'aide du logiciel FlowJo v10.5.3 (TreeStar, Inc.). Nous avons identifié les lymphocytes iNKT dans la fenêtre CD3+ TCRJ α 24+. En ce qui concerne les LT CD8+ innés, ils sont définis comme étant Eomes+ NKG2A+ KIR2D+ KIR3DL1-2+ (ou Eomes+ KIRs+) au sein des LT CD8+ totaux. Nous avons également étudié les différents compartiments de lymphocytes T CD8+ mémoires : soit en utilisant les marquages CD45RA et CCR7 soit, lorsque cela n'a pas été possible, en utilisant le marquage Eomes+ comme marqueur mémoire (population Eomes+ KIRs-).

La stratégie de fenêtrage est détaillée dans la **Figure 6** ci-dessous.

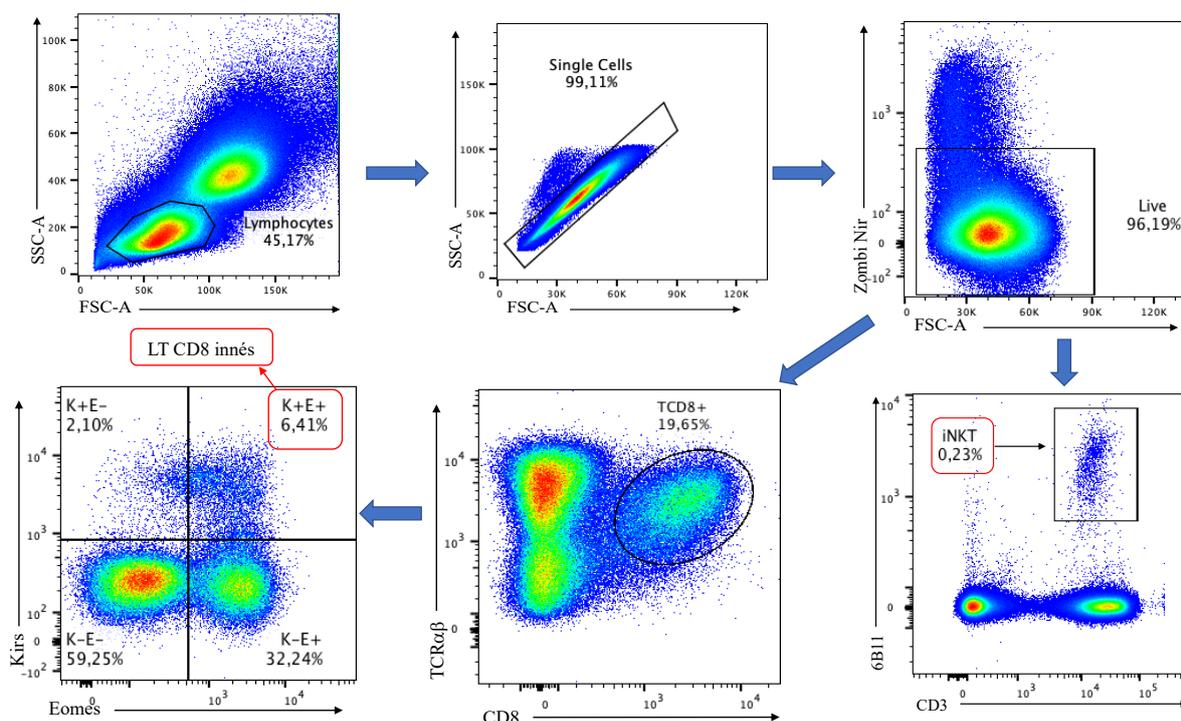


Figure 6. Stratégie de fenêtrage permettant d'identifier les lymphocytes iNKT et LT CD8+ innés.

6. Analyse statistique

Les résultats expérimentaux ont été exprimés en moyenne \pm SEM (écart à la moyenne). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® version 6 en utilisant le test non paramétrique sur k échantillons indépendants de Kruskal-Wallis puis le test de comparaison multiple de Dunn.

Les valeurs de *p-value* inférieures à 0,05 (*), inférieures à 0,01 (**) et inférieures à 0,001 (***) ont été considérées comme significatives ; les valeurs de *p-value* \geq 0,05 et l'abréviation « ns » correspondent à des différences non significatives.

RESULTATS

1. Description de la cohorte

Ce travail a porté sur 33 patients atteints de gammopathies monoclonales à différents stades évolutifs : MGUS, MM symptomatique au diagnostic (NDMM), MM en rechute et MM en RC.

L'âge médian est de 65 ans (41 – 90) avec 7 patients (21,2%) de plus de 75 ans et un sexe ratio H/F à 1,2. Comme décrit dans la littérature (1), l'isotype le plus fréquent est l'IgG Kappa qui représente 42,4% des gammopathies monoclonales de notre cohorte.

Avec un follow-up de 20mois, la médiane d'OS n'est pas atteinte dans la cohorte (85% de patients vivants).

Ces caractéristiques cliniques sont détaillées dans le **Tableau 2**.

Cohorte globale (n = 33)	Caractéristiques	Effectif (%)
	Age	
	≤ 65 ans	17 (51,5)
	> 65 ans	16 (48,5)
	≥ 75 ans	7 (21,2)
	Isotype	
	IgG Kappa	14 (42,4)
	IgG Lambda	9 (27,3)
	IgA Lambda	4 (12,1)
	Chaines légères Kappa	3 (9,1)
	Chaines légères Lambda	3 (9,1)
	Sexe	
	Homme	18 (54,5)
Femme	15 (45,4)	

Tableau 2. Caractéristiques cliniques de la cohorte globale

L'analyse des facteurs pronostiques et des critères de traitement a été réalisée en excluant les patients suivis pour MGUS (car non concernés par ces deux paramètres) soit un effectif de 24 patients. Dans ce sous-groupe, les médianes de PFS et d'OS sont respectivement de 37,5 mois (IC 95% : 31,5 - 43,4) et 76,8 mois (IC 95% : 34,4 - 119,3).

Par ailleurs, 11 patients (45,8%) présentaient des facteurs de mauvais pronostic : présence d'EMD pour 6 patients (25%), cytogénétique défavorable (t(4,14) et/ou del17p) pour 6 patients (25%) et présence de plasmoblastes pour 1 patient.

Les différents facteurs pronostiques ainsi que les critères de traitement sont figurés dans le **Tableau 3**.

MM au diagnostic, en rechute et en RC (n = 24)	Caractéristiques	Effectif (%)
	Haut risque total	11 (45,8)
	ISS	
	1 & 2	19 (79,2)
	3	4 (16,7)
	Donnée manquante	1 (4,2)
	R-ISS	
	1 & 2	18 (75)
	3	1 (4,2)
	Donnée manquante	5 (20,8)
	Cytogénétique	
	del17p	4 (16,7)
	t(4,14)	2 (8,3)
	t(11,14)	4 (16,7)
	EMD	6 (25)
	Plasmoblastique	1 (4,2)
	Critères CRAB	
	Hypercalcémie	4 (16,7)
	Insuffisance rénale	3 (12,5)
	Anémie	12 (50)
	Lésion osseuse	20 (83,3)
	Ratio sFLC > 100	10 (41,7)
	Plasmocyte médullaire > 60%	4 (16,7)

Tableau 3. Facteurs pronostiques et critères CRAB en cas de MM au diagnostic, en rechute et en RC

Dans le sous-groupe RC (n = 8 ; **Tableau 4**), tous les patients étaient en première ligne de traitement et 5 patients (62,5%) étaient en RC stringente.

Tous les patients ont reçu un inhibiteur du protéasome (Bortezomib pour 7 patients et Ixazomib pour 1 patient) associé au Thalidomide (n = 6), au Lenalidomide (n = 1), ou au Melphalan (n = 1) ; 2 patients ont reçu une quadruplette comprenant du Daratumumab.

Enfin, 7 patients ont reçu une intensification thérapeutique par autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (ASCT).

Depuis l'inclusion dans l'étude, aucun patient du sous-groupe RC n'a rechuté (médiane de suivi de 16,8 mois).

Sous-groupe RC (n = 8)	Caractéristiques	Effectif (%)
	RC stringente	5 (62,5)
	Traitements reçus	
	Bortezomib	7 (87,5)
	Ixazomib	1 (12,5)
	Thalidomide	6 (75)
	Lenalidomide	1 (12,5)
	Daratumumab	2 (25)
	Melphalan	1 (12,5)
	ASCT	7 (87,5)

Tableau 4. Caractéristiques cliniques du sous-groupe RC

Enfin, dans le sous-groupe rechute (n = 8 ; **Tableau 5**), tous les patients étaient en première rechute de leur MM. 5 patients (62,5%) présentaient initialement une rechute biologique contre 3 patients (37,5%) ayant eu d'emblée une rechute clinique.

Lors de leur première ligne 100% des patients avaient reçu du Bortezomib associé au Thalidomide (n = 3) ou au Melphalan (n = 5). Par ailleurs, 3 patients avaient bénéficié d'une intensification par ASCT.

Sous-groupe Rechute (n = 8)	Caractéristiques	Effectif (%)
	Rechute clinique	5 (62,5)
	Rechute biologique	3 (37,5)
	Traitements reçus	
	Bortezomib	8 (100)
	Thalidomide	3 (37,5)
	Lenalidomide	1 (12,5)
	Melphalan	5 (62,5)
	ASCT	3 (37,5)

Tableau 5. Caractéristiques cliniques du sous-groupe rechute

2. Lymphocytes iNKT

En cas de cancer actif, les lymphocytes iNKT ont été décrit comme étant altérés tant sur le plan quantitatif que fonctionnel (34).

Nous avons donc étudié d'une part la fréquence des lymphocytes iNKT et d'autre part leur fonctionnalité *via* leur compartimentation CD4/CD8 et l'expression de CD161 au sein des différents sous-groupes de patients atteints de gammopathies monoclonales.

2.1 Fréquence des lymphocytes iNKT

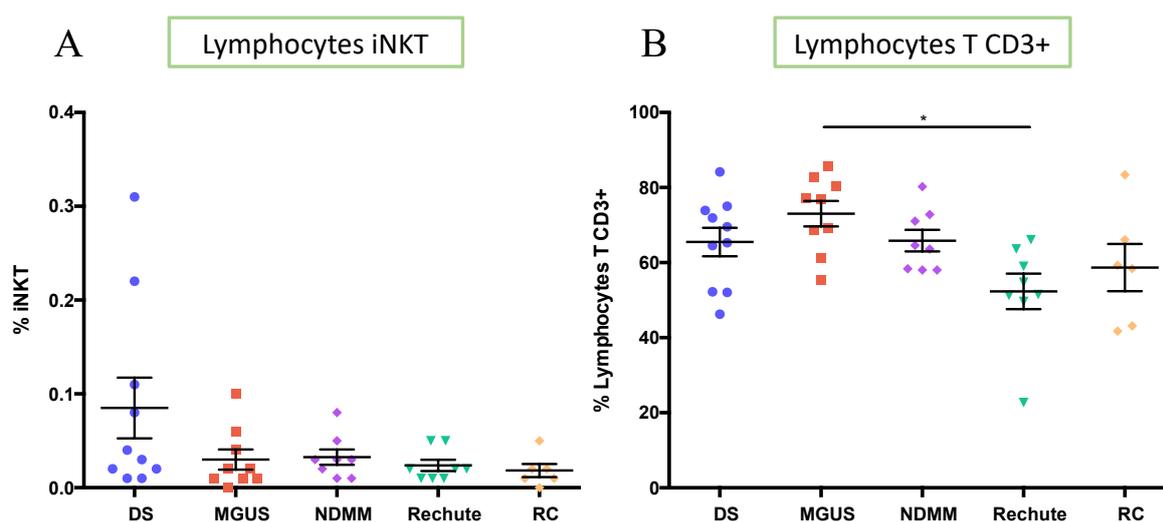


Figure 7. Fréquence des lymphocytes iNKT et des lymphocytes T CD3+ dans les différents sous-groupes : DS (n=10) ; MGUS (n=9) ; NDMM (n=8) ; rechute (n=8) ; RC (n=6). Test non paramétrique de Kruskal-Wallis (moyenne ± SEM). *p<0,05

(A) Fréquence des lymphocytes iNKT parmi les lymphocytes T CD3+

(B) Fréquence des lymphocytes T CD3+

Dans notre cohorte, la fréquence des lymphocytes iNKT a tendance à diminuer de manière non significative en cas de gammopathies monoclonales en comparaison avec les DS (**Figure 7A**). Cette diminution est effective dès le stade précancéreux MGUS et ne semble pas se modifier ou se corriger en cas de maladie plus avancée (NDMM ou rechute) ou en cas de contrôle de la maladie (sous-groupe RC).

A noter, que cette diminution de la fréquence des lymphocytes iNKT n'est pas liée à un déficit en lymphocytes T totaux. En effet, comme illustré sur la **Figure 7B**, il n'y a pas de différence significative concernant la proportion de LT CD3+ dans les différents sous-groupes (en dehors du sous-groupe rechute).

2.2 Compartimentation CD4/CD8 des lymphocytes iNKT

Les lymphocytes iNKT ont des phénotypes variables concernant l'expression de CD4 et de CD8 : ils peuvent être double négatif (DN), CD4+ CD8- ou CD4- CD8+.

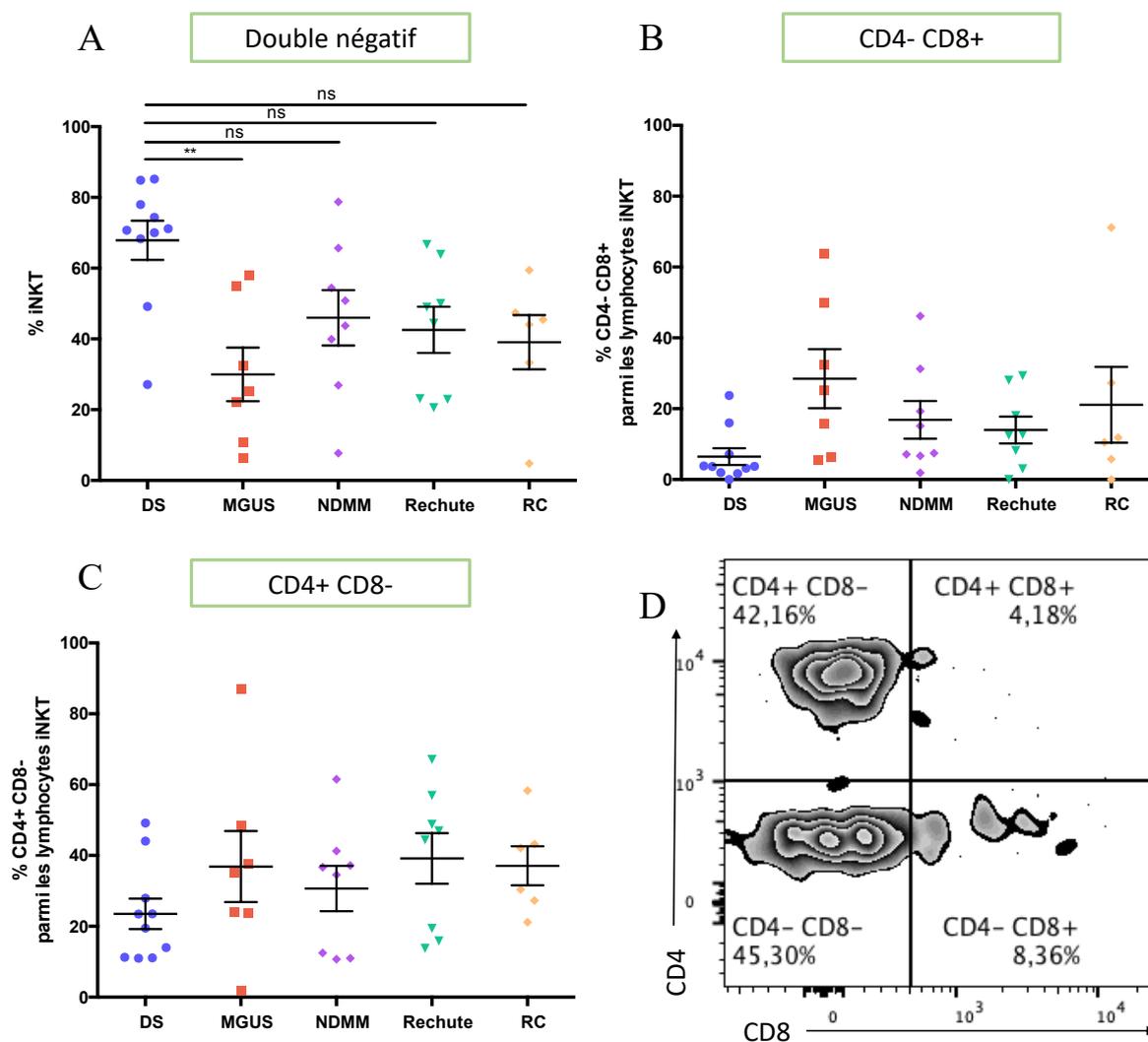


Figure 8. Analyse des compartiments CD4/CD8 au sein des lymphocytes iNKT dans les différents sous-groupes : DS (n=10) ; MGUS (n=7) ; NDMM (n=8) ; rechute (n=8) ; RC (n=6). Test non paramétrique de Kruskal-Wallis (moyenne \pm SEM). **p<0,01 ; ns : non significatif

(A) Fréquence des lymphocytes iNKT double négatif (CD4- CD8-) parmi les lymphocytes iNKT

(B) Fréquence des lymphocytes iNKT CD4- CD8+ parmi les lymphocytes iNKT

(C) Fréquence des lymphocytes iNKT CD4+ CD8- parmi les lymphocytes iNKT

(D) Exemple de compartimentation CD4/CD8 au sein des lymphocytes iNKT en cytométrie en flux

Nos résultats suggèrent une diminution de la proportion de lymphocytes iNKT double négatif (DN) dans les sous-groupes MGUS (29,97 \pm 7,58% ; p=0,0072), NDMM (45,99 \pm 7,82%), rechute (42,6 \pm 6,52%) et RC (38,08 \pm 7,65% ; p=0,0921) par rapport au groupe DS (67,9 \pm

5,55%) (**Figure 8A**). Cette tendance est observée dès le stade MGUS et ne semble pas se modifier avec l'avancée de la maladie ou l'obtention d'une RC.

En revanche, nous n'observons pas de variation entre nos sous-groupes concernant les lymphocytes iNKT de phénotype CD4- CD8+ (**Figure 8B**) et CD4+ CD8- (**Figure 8C**).

2.3 Expression de CD161 par les lymphocytes iNKT

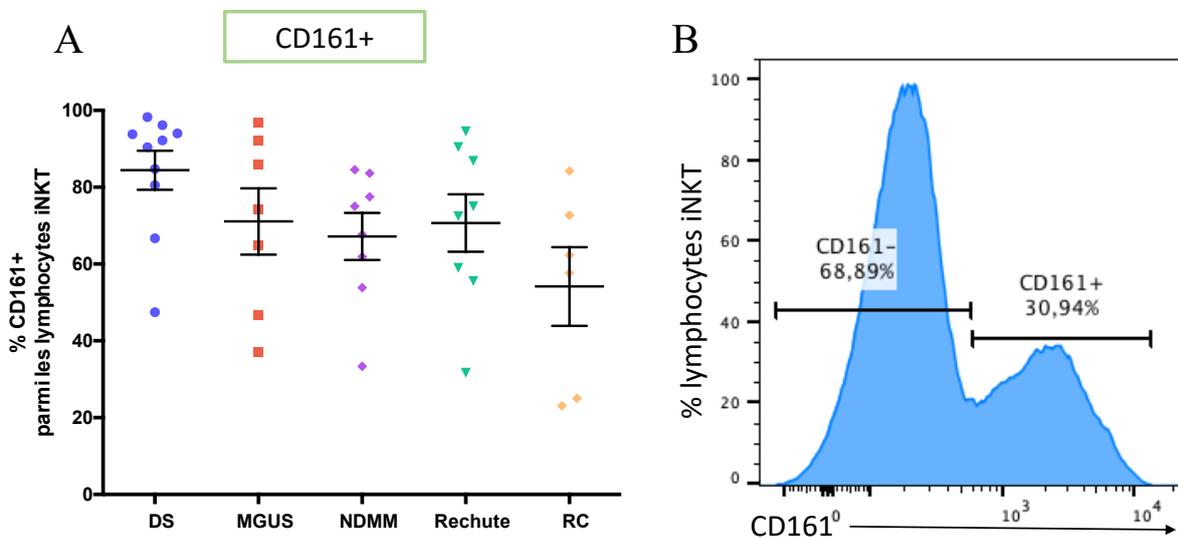


Figure 9. Analyse de l'expression de CD161 par les lymphocytes iNKT dans les différents sous-groupes : DS (n=10) ; MGUS (n=7) ; NDMM (n=8) ; rechute (n=8) ; RC (n=6). Test non paramétrique de Kruskal-Wallis (moyenne ± SEM).

(A) Fréquence des lymphocytes iNKT CD161+ parmi les lymphocytes iNKT

(B) Exemple d'histogramme d'expression de CD161 par les lymphocytes iNKT en cytométrie en flux

Concernant l'expression de CD161 par les lymphocytes iNKT, nous n'observons pas de différence majeure ni entre les patients et les DS ni entre les différents sous-groupes de gammopathies monoclonales. La proportion de lymphocytes iNKT est en effet de $84,41 \pm 5,06\%$ chez les DS et semble discrètement abaissée en cas de gammopathie monoclonale quel qu'en soit le stade : $71,09 \pm 8,62\%$ pour les MGUS, $67,18 \pm 6,11\%$ pour les NDMM, $70,70 \pm 7,47\%$ en cas de rechute et $54,16 \pm 10,23\%$ en cas de RC (**Figure 9A**).

2.4 Expression de PLZF par les lymphocytes iNKT

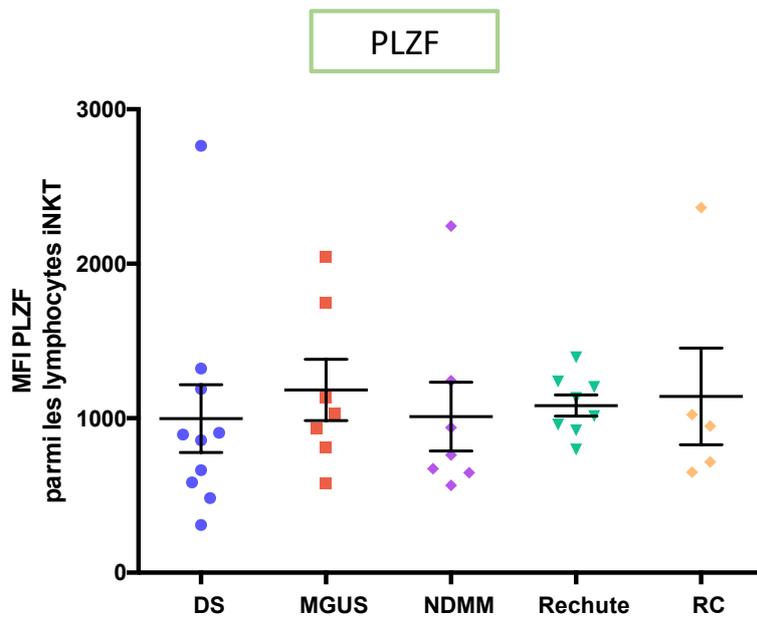


Figure 10. Mesure de l'intensité moyenne de fluorescence de PLZF dans les différents sous-groupes de gammopathies monoclonales : DS (n=10) ; MGUS (n=7) ; NDMM (n=7) ; rechute (n=8) ; RC (n=5). Test non paramétrique de Kruskal-Wallis (moyenne \pm SEM).

Comme illustré par la **Figure 10**, il ne semble pas y avoir de différence significative entre les différents sous-groupes concernant l'intensité moyenne de fluorescence de PLZF. Ces résultats suggèrent que l'expression de PLZF n'est pas modifiée en cas de gammopathie monoclonale, à la différence de ce qui a pu être décrit dans la LMC.

Au total, au sein de notre cohorte de gammopathies monoclonales, il semble exister un déficit quantitatif et fonctionnel des lymphocytes iNKT qui se traduit par une perte partielle du sous-compartiment double-négatif.

3. Lymphocytes T CD8+ innés

Nous nous sommes également intéressés aux LT CD8+ innés connus pour jouer un rôle anti-tumoral dans d'autres pathologies onco-hématologiques (LMC, cancer du sein et de l'ovaire).

3.1 Fréquence des LT CD8+ innés

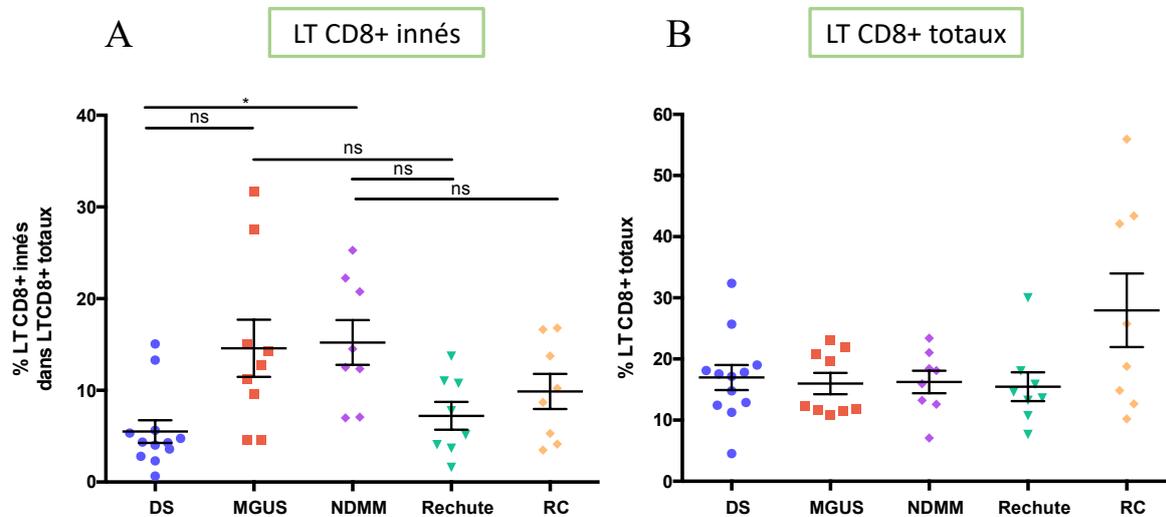


Figure 11. Fréquence des LT CD8+ innés et des LT CD8+ totaux dans les différents sous-groupes : DS (n=12) ; MGUS (n=9) ; NDMM (n=8) ; rechute (n=8) ; RC (n=8). Test non paramétrique de Kruskal-Wallis (moyenne ± SEM). *p<0,05 ; ns : non significatif.

(A) Fréquence des LT CD8+ innés parmi les LT CD8+ totaux

(B) Fréquence des LT CD8+ totaux

Comme illustré par la **Figure 11A**, la fréquence des LT CD8+ innés a tendance à augmenter dans les sous-groupes MGUS ($14,59 \pm 3,11\%$; $p=0,0517$) et NDMM ($15,22 \pm 2,43\%$; $p=0,0168$) en comparaison avec les DS ($5,51 \pm 1,24\%$).

En revanche, au sein des sous-groupes rechute et RC, la proportion de LT CD8+ innés est similaire à celle observée chez les DS à savoir respectivement $7,23 \pm 1,51\%$ et $15,22 \pm 2,43\%$ (**Figure 11A**). Il faut noter que ces variations ne semblent pas liées à une altération quantitative des LT CD8+ totaux (**Figure 11B**).

3.2 Phénotype mémoire EMRA des LT CD8+ innés

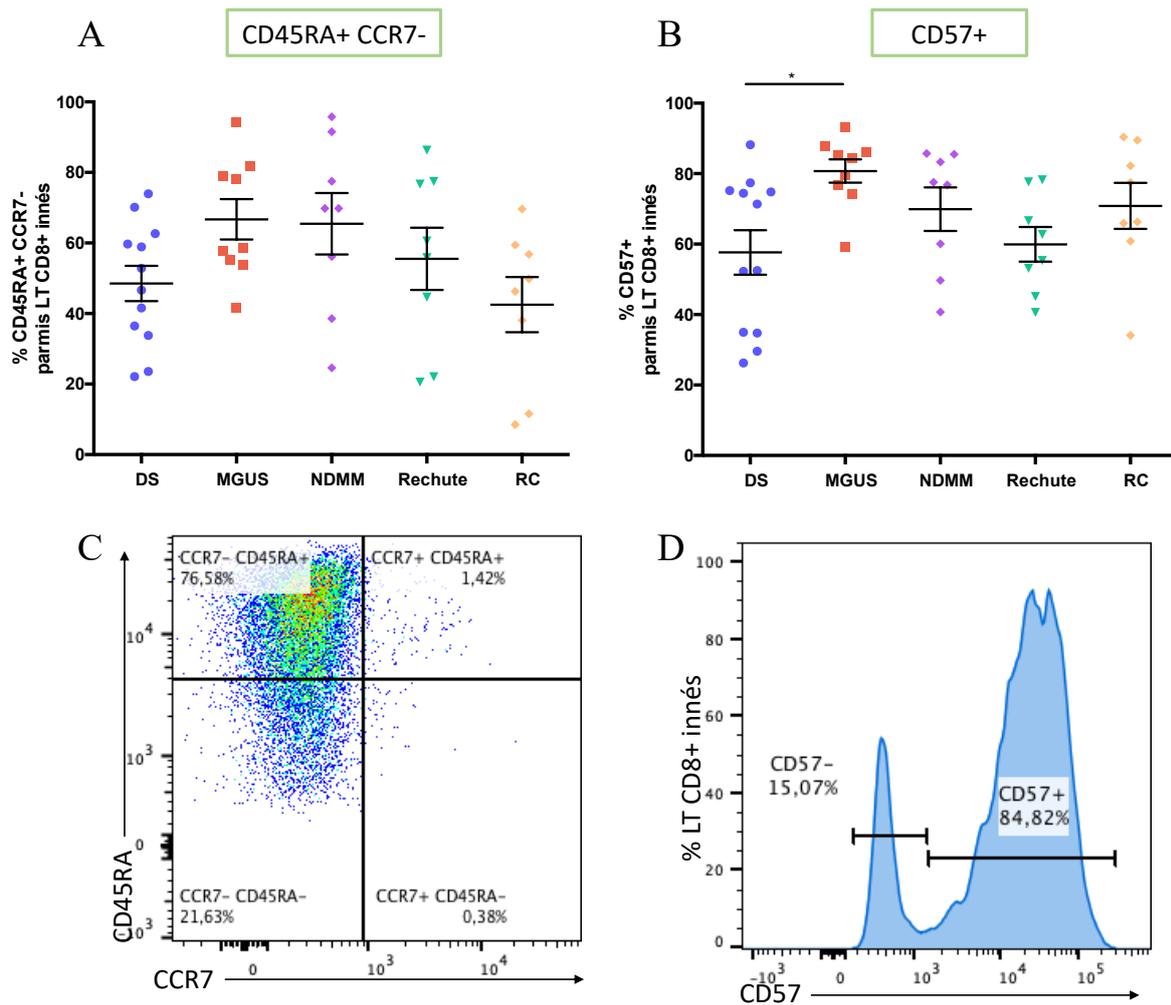


Figure 12. Analyse de la proportion de LT CD8+ innés exprimant le phénotype mémoire EMRA (CD45RA+ CCR7- CD57+) dans les différents sous-groupes : DS (n=12) ; MGUS (n=9) ; NDMM (n=8) ; rechute (n=8) ; RC (n=8). Test non paramétrique de Kruskal-Wallis (moyenne \pm SEM). * $p < 0,05$

(A) Fréquence des LT CD8+ innés CD45RA+ CCR7- parmi les LT CD8+ innés

(B) Fréquence des LT CD8+ innés CD57+ parmi les LT CD8+ innés

(C) Exemple de marquage CD45RA/CCR7 au sein des LT CD8+ innés en cytométrie en flux

(D) Exemple d'histogramme d'expression de CD57 par les LT CD8+ innés en cytométrie en flux

Au sein des LT CD8+ innés, la proportion de cellules exprimant le phénotype CD45RA+ CCR7- a tendance à augmenter de manière non significative dans le sous-groupe MGUS ($66,72 \pm 5,71\%$) et NDMM ($65,47 \pm 8,72\%$) par rapport au groupe DS ($48,53 \pm 4,99\%$) (**Figure 12A**). En revanche, il ne semble pas y avoir de différence entre les sous-groupes rechute ($55,51 \pm 8,83\%$) ou RC ($42,53 \pm 7,82\%$) en comparaison avec les DS (**Figure 12A**).

La **Figure 12B** illustre les résultats concernant l'expression de CD57 par les LT CD8+ innés. La proportion de LT CD8+ innés exprimant CD57 semble augmentée en cas de MGUS ($80,74 \pm 3,32$ % par rapport aux DS ($57,65 \pm 6,31\%$) ; $p=0,0480$). Dans les autres sous-groupes de gammopathies monoclonales, l'expression de CD57 par les LT CD8+ innés semble peu varier.

Au total, il semble exister une hétérogénéité importante au sein de nos différents sous-groupes en ce qui concerne la fréquence et les caractéristiques phénotypiques des LT CD8+ innés. Nos analyses suggèrent l'existence de deux profils distincts : d'une part les sous-groupes MGUS et NDMM, aux seins desquels nous observons une augmentation de la fréquence des LT CD8+ innés et une expression plus importante du phénotype mémoire terminal EMRA par ces derniers ; et d'autre part les sous-groupes RC et rechute qui ressemblent davantage aux DS.

L'une des problématiques est de savoir si ces variations sont spécifiques aux LT CD8+ innés ou si elle concerne plus largement l'ensemble des LT CD8+ mémoires. Nous nous sommes donc intéressés aux 4 compartiments de LT CD8+ mémoires (**Figure 13**) :

- LT CD8+ naïfs (CD45RA+ CCR7+)
- LT CD8+ EMRA (CD45RA+ CCR7-) comprenant les LT CD8+ innés
- LT CD8+ central-mémoires ou TCM (CD45RA- CCR7+)
- LT CD8+ effecteur-mémoires ou TEM (CD45RA- CCR7-)

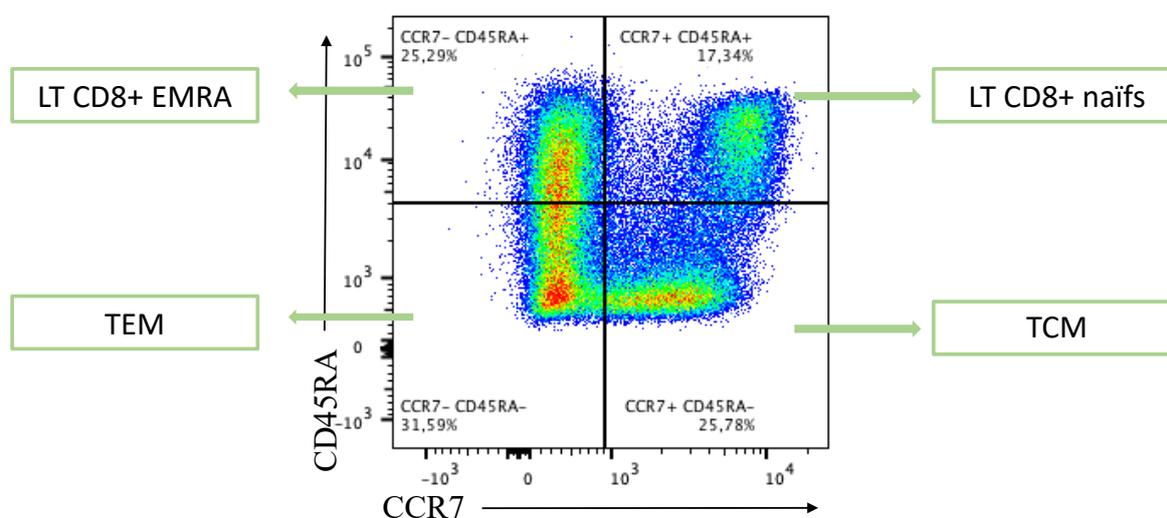


Figure 13. Identification des différents compartiments de LT CD8+ mémoires en cytométrie de flux.

Dans la suite de ce travail, nous avons étudié la répartition de ces 4 compartiments de LT CD8+ mémoires au sein de nos sous-groupes de gammopathies monoclonales (**Figure 14**).

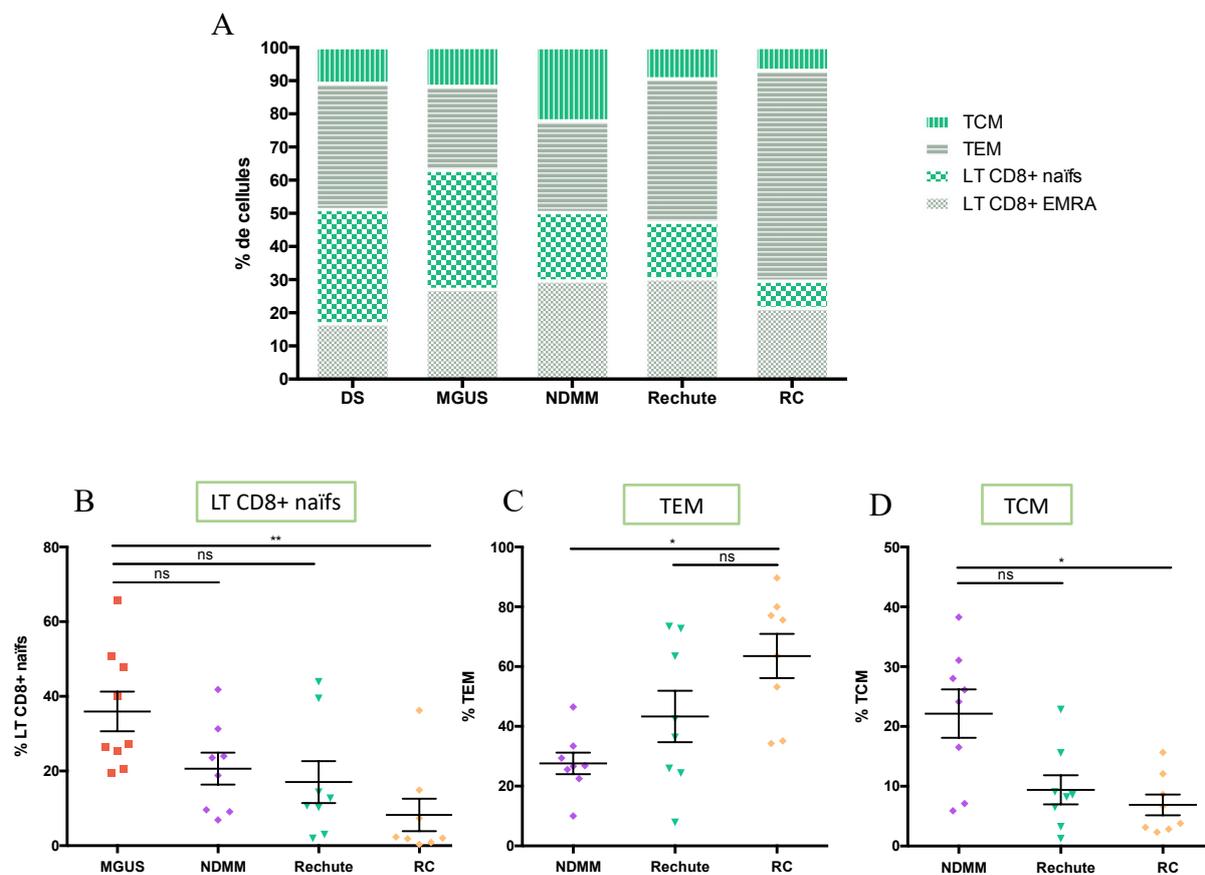


Figure 14. Analyse de la fréquence des différents compartiments de LT CD8+ mémoires parmi les différents sous-groupes : MGUS (n=9) ; NDMM (n=8) ; rechute (n=8) ; RC (n=8). Test non paramétrique de Kruskal-Wallis (moyenne ± SEM). *p<0,05 ; **p<0,01 ; ns : non significatif

- (A) Histogramme de répartition des compartiments de LT CD8+ mémoires au sein des sous-groupes
 (B) Fréquence des LT CD8+ naïfs parmi les LT CD8+
 (C) Fréquence des TEM parmi les LT CD8+
 (D) Fréquence des TCM parmi les LT CD8+

Aux vues des résultats de la **Figure 14**, nous avons le sentiment qu'il existe, en cas de gammopathies monoclonales, un remaniement de l'ensemble des LT CD8+ mémoires qui semble se faire au dépend des LT CD8+ naïfs. En effet, la proportion de LT naïfs a tendance à décroître en particulier dans les sous-groupes NDMM (20,63 ± 4,29%), rechute (17,04 ± 5,61%) et RC (8,25 ± 4,35% ; p=0,0052) par rapport au stade MGUS (35,95 ± 5,33%) (**Figure 14B**). Cette diminution semble plus marquée lorsque l'on avance dans la maladie (sous-groupe rechute) et lorsque la maladie est contrôlée par le traitement (sous-groupe RC).

Par ailleurs, il semble que la proportion relative de chaque compartiment de LT CD8+ mémoires fluctue selon le sous-groupe de gammopathie monoclonale (**Figure 14A**). Dans le sous-groupe RC, nous observons par exemple une proportion plus importante de TEM (63,55 ± 7,38%) par rapport aux sous-groupe NDMM (27,62 ± 3,62% ; p=0,0138) et rechute (43,32 ± 8,60%) (**Figure 14C**). De même, en cas de NDMM, il semblerait que la proportion de TCM

($22,14 \pm 4,04\%$) soit augmentée par rapport au sous-groupe RC ($6,89 \pm 1,73\%$; $p=0,0192$) et de façon moindre au sous-groupe rechute ($9,41 \pm 2,44\%$) (**Figure 14D**).

Au total, ces résultats suggèrent une possible reprogrammation des LT CD8+ mémoires au dépend des LT CD8+ naïfs en cas de gammopathie monoclonale. Selon l'évolution de la maladie et le statut du MM cette reprogrammation semble différente : au profit des LT EMRA en cas de MGUS, au profit des TEM en cas de RC ou au profit des TCM en cas de NDMM.

3.3 Activation et fonctionnalité des LT CD8+ innés et des LT CD8+ mémoires

Par la suite, il nous a semblé pertinent d'évaluer l'activation et la fonctionnalité des LT CD8+ innés et plus largement des LT CD8+ mémoires.

Concernant les marqueurs d'activation/exhaustion, nous nous sommes intéressés à deux *checkpoint* immunitaires : PD-1 et TIM3. Enfin, pour évaluer les fonctions cytotoxiques des LT CD8+ innés et des LT CD8+ mémoires, nous avons mesuré la proportion de cellules exprimant l'IFN γ et la perforine. Des exemples de marquages en cytométrie en flux de ces différents paramètres sont présentés en annexe.

Au sein de notre cohorte, nous n'avons pas mis en évidence de différence majeure concernant la proportion de LT CD8+ innés exprimant PD-1 et TIM3 et les marqueurs de fonctionnalité Perforine et IFN γ (données non illustrées).

Toujours dans l'hypothèse d'une reprogrammation globale des LT CD8+ associée aux gammopathies monoclonales, nous avons évalué ces marqueurs d'activation et de cytotoxicité dans la population des LT CD8+ mémoires (**Figure 15**).

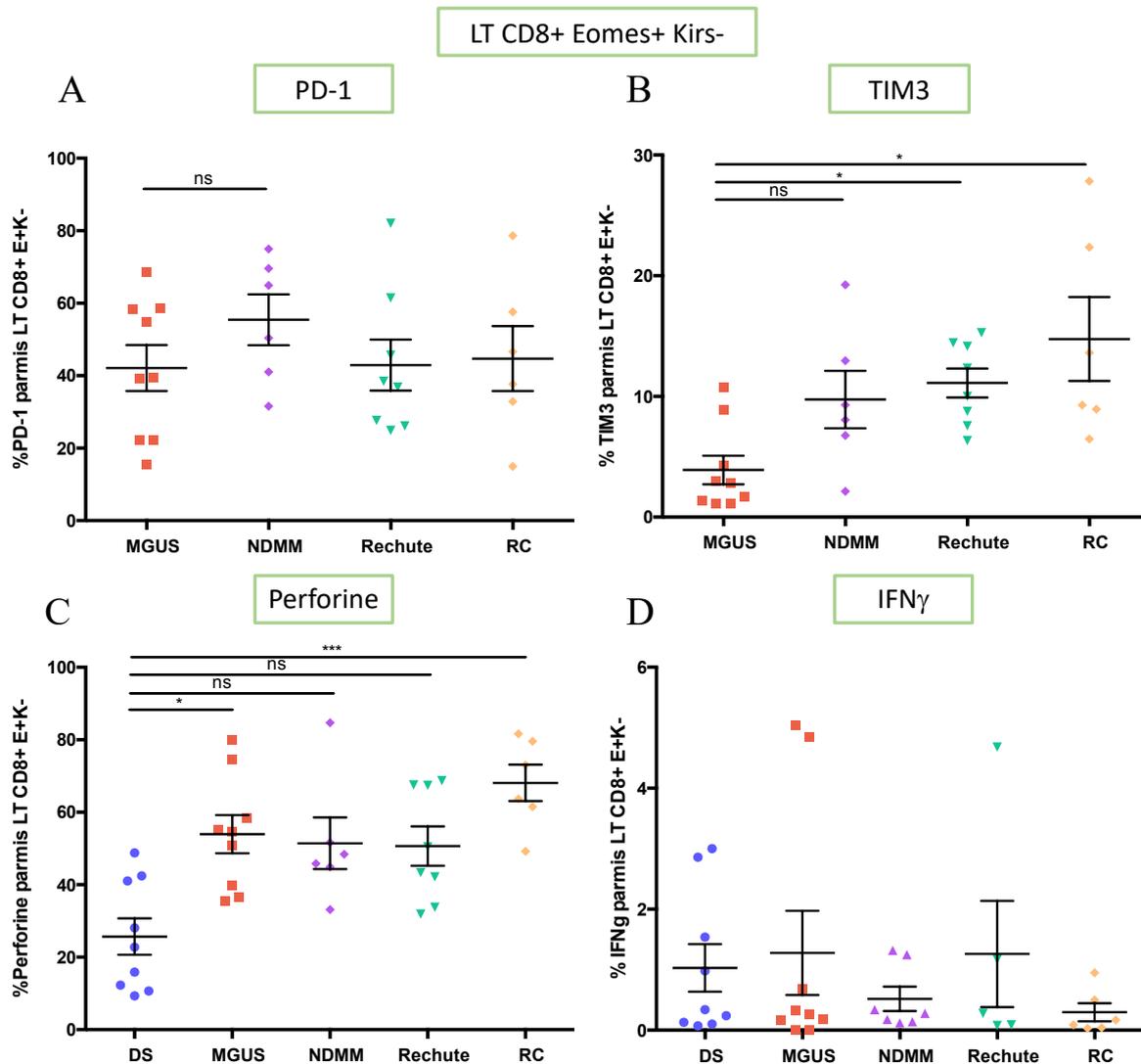


Figure 15. Analyse des marqueurs d'activation/exhaustion et de la fonctionnalité des LT CD8+ E+K- dans les différents sous-groupes : DS (n=9) ; MGUS (n=9) ; NDMM (n=6) ; rechute (n=8) ; RC (n=6). Test non paramétrique de Kruskal-Wallis (moyenne \pm SEM). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ns : non significatif.

- (A) Fréquence des LT CD8+E+K- exprimant PD-1 parmi les LT CD8+ E+K-
- (B) Fréquence des LT CD8+E+K- exprimant TIM3 parmi les LT CD8+ E+K-
- (C) Fréquence des LT CD8+E+K- exprimant la perforine parmi les LT CD8+ E+K-
- (D) Fréquence des LT CD8+E+K- exprimant la IFN γ parmi les LT CD8+ E+K-

L'expression de TIM3 par les LT E+K- a tendance à être augmentée dans les sous-groupes rechute ($11,11 \pm 1,21\%$; $p=0,0348$), RC ($14,75 \pm 3,48\%$; $p=0,0219$) et NDMM ($9,75 \pm 2,38\%$; $p=0,3866$) par rapport au sous-groupe MGUS ($3,91 \pm 1,19\%$) (**figure 15B**).

Concernant l'expression de PD-1, nous n'observons pas de variation significative au sein de notre cohorte (**Figure 15A**).

S'agissant des marqueurs de cytotoxicité, la perforine semble davantage exprimée par les LT CD8⁺ E+K⁻ dans tous les sous-groupes : RC ($68,12 \pm 5,03\%$; $p=0,0010$), MGUS ($53,96 \pm 5,25\%$; $p=0,0419$), NDMM ($51,44 \pm 7,13\%$) et rechute ($50,58 \pm 5,44\%$) par rapport aux DS ($25,70 \pm 5,05\%$) (**Figure 15C**). A noter, que l'expression de la perforine par les LT E+K⁻ semble d'avantage augmentée en cas de RC en comparaison avec les groupes de maladie active (NDMM et rechute).

Enfin, nous n'observons aucune différence d'expression d'IFN γ par les LT E+K⁻ dans les différents sous-groupes (**Figure 15D**).

4. Impact des données cliniques sur les LT innés

Afin de d'étayer davantage nos résultats, nous avons tenté d'identifier des données cliniques susceptibles d'influencer nos résultats concernant les LT innés. Nous avons en particulier évalué l'impact des différents traitements reçus : immunomodulateurs, ASCT et anticorps monoclonaux anti-CD38.

Du fait de l'effectif limité, il est difficile de tirer des conclusions franches. Néanmoins, certaines tendances apparaissent, notamment concernant les patients ayant reçu du Lenalidomide pour lesquels l'expression de CD161 par les lymphocytes iNKT semble augmentée. De la même manière, en cas de traitement par Daratumumab, la proportion de lymphocytes iNKT DN et CD161⁺ a tendance à être augmentée.

Ces résultats demandent évidemment à être confirmés sur une cohorte plus importante.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était d'étudier et de décrire la fréquence et la fonctionnalité de deux populations de lymphocytes T innés non conventionnels : les lymphocytes iNKT et les LT CD8+ innés à différents stades de gammopathies monoclonales.

En cas de gammopathies monoclonales, il semble exister une altération à la fois quantitative et phénotypique des lymphocytes iNKT et ce dès le stade MGUS, ce qui n'avait jamais été décrit. Cette reprogrammation des lymphocytes iNKT se traduit, au sein de notre cohorte, par une perte partielle du phénotype double négatif. Dans la littérature, les lymphocytes iNKT DN sont associés à une réponse cytotoxique Th1 plus élevée (35) et sont donc associés à une action cytotoxique plus importante. Nos résultats suggèrent que les lymphocytes iNKT DN pourraient participer à l'immunovigilance anti-tumorale des gammopathies monoclonales et qu'une reprogrammation de ces cellules pourraient intervenir chez nos patients.

Enfin, l'expression de PLZF n'apparaît pas modifiée dans nos différents sous-groupes. Ces résultats laissent penser que les mécanismes par lesquels les lymphocytes iNKT interviennent dans les gammopathies monoclonales sont distincts de ceux décrits dans la LMC, où la baisse d'expression de PLZF est corrélée à une perte de l'arsenal cytotoxique des lymphocytes iNKT (33).

Pour l'ensemble de nos résultats, nous n'observons pas de différence selon le stade de la gammopathie monoclonale (MGUS, NDMM ou MM en rechute) et selon le contrôle de la maladie par les traitements (sous-groupe RC). Il semblerait donc que l'altération quantitative et phénotypique des lymphocytes iNKT n'explique pas, à elle seule, le passage de l'état précancéreux au stade MM.

Les données de la littérature sont assez claires sur le fait qu'il existe un lien entre lymphocytes iNKT et MM. Pour preuve, des travaux menés par Dhodapkar et al, ont montré qu'un déficit de production d'IFN γ par les lymphocytes iNKT était observé en cas de MM actif par rapport aux stades MGUS et sMM (29). D'autres équipes ont démontré que les lymphocytes iNKT pouvaient constituer une cible thérapeutique intéressante dans le MM. Par exemple, des résultats encourageants ont été obtenus en cas de vaccination à base de cellules dendritiques autologues modifiées pour exprimer l' α -galactosyl-céramide, un glycosphingolipide ligand de CD1d permettant l'activation des lymphocytes iNKT (36).

Nos résultats semblent donc cohérents avec ce qui est décrit dans la littérature et confortent davantage le rôle de cette population de LT innés dans l'immunovigilance anti-tumorale des gammopathies monoclonales.

En ce qui concerne le lien entre LT CD8+ innés et MM, les données de la littérature sont, à notre connaissance, inexistantes.

Dans notre cohorte, nous avons identifié deux profils distincts concernant la fréquence des LT CD8+ innés. Dans les sous-groupes MGUS et NDMM, il semble exister, *a contrario* de notre hypothèse de départ, une augmentation des LT CD8+ innés. En revanche, dans les sous-groupes rechute et RC, la proportion de ces cellules est similaire aux valeurs observées chez les DS. Ces variations quantitatives semblent associées à des modifications phénotypiques, en particulier concernant l'expression du phénotype mémoire EMRA (CD45RA+ CCR7- CD57+) par les LT CD8+ innés. Nous avons observé qu'en cas de MGUS et de NDMM, la proportion de LT CD8+ innés exprimant le phénotype EMRA a tendance à augmenter en comparaison avec les DS et avec les autres types de gammopathies monoclonales (rechute et RC). En revanche nous n'avons pas constaté de différence notable concernant l'expression de la perforine et de l'IFN γ par les LT CD8+ innés. Cela implique que la présence d'une gammopathie monoclonale n'est *a priori* pas associée à une altération des capacités cytotoxiques et fonctionnelles des LT CD8+ innés.

Contrairement à notre hypothèse de départ, nous n'observons donc pas une diminution mais une augmentation de la fréquence des LT CD8+ innés en cas de MGUS et de NDMM. Cette augmentation quantitative semble être associée à un enrichissement en phénotype mémoire terminale EMRA et une préservation des fonctions cytotoxiques des LT CD8+ innés.

Ces résultats ainsi que l'absence de variation concernant l'expression de PLZF par les lymphocytes iNKT nous laisse supposer que les LT CD8+ innés interviennent dans l'évolution des gammopathies monoclonales indépendamment des lymphocytes iNKT.

En analysant l'ensemble du compartiment mémoire, il est apparu que nos résultats sur les LT CD8+ innés pouvaient s'inscrire dans une reprogrammation globale des LT CD8+ mémoires. Cette reprogrammation semble se faire au détriment des LT CD8+ naïfs, qui semblent diminués en cas de gammopathie monoclonale à tous les stades évolutifs. La répartition des différents types de LT CD8+ mémoire est ensuite très variable et hétérogène selon le stade de la gammopathie monoclonale : prépondérance des LT CD8+ EMRA en cas de MGUS et de rechute, des LT central-mémoires en cas de NDMM et des LT effecteur-mémoires en cas de RC.

Par ailleurs, au sein des LT CD8+ mémoires, nous observons une augmentation significative de l'expression de perforine dans tous nos sous-groupes. Le statut de gammopathies monoclonales semble donc associé à une reprogrammation évolutive des LT CD8+ mémoires et à une exacerbation de leurs fonctions cytotoxiques.

Concernant, les marqueurs d'activation/exhaustion (PD-1, TIM3), leur expression par les LT CD8+ mémoires (Eomes+ Kirs-) a tendance à être augmentée en cas de NDMM et de rechute en comparaison avec les MGUS. Ces analyses suggèrent que le passage du stade MGUS à l'état cancéreux pourraient s'accompagner d'une activation puis d'un épuisement des LT CD8+ mémoires. L'expression de PD-1 dans le MM a déjà été étudiée notamment en post autogreffe où il apparaît qu'une surexpression de PD-1 par les LT CD8 totaux est associée à un épuisement immunitaire et un risque plus élevé de rechute (37). Nous apportons ici des données nouvelles concernant les compartiments mémoires des LT CD8+.

Preuve du rôle de PD-1 dans le MM, de nombreuses études cliniques se sont intéressées au Nivolumab, un inhibiteur de checkpoint anti-PD1. Paradoxalement, le Nivolumab en monothérapie montre des résultats très décevants dans le MM avec 63% de patients en maladie stable et seulement 4% de RC (38). Ces résultats suggèrent l'existence d'autres voies d'exhaustion dans le MM. En outre, des études récentes ont été menées sur le récepteur inhibiteur TIGIT (39). Son expression sur les LT CD8+ a été retrouvée augmentée en cas de rechute de MM tout en étant associée à une altération quantitative et fonctionnelle des LT CD8+. Les premiers résultats concernant l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-TIGIT dans le MM sont également encourageant puisque que celle-ci est associée à une restauration des fonctions effectrices des LT CD8+ et une diminution de l'Ig monoclonale (40). Il semblerait donc intéressant d'évaluer l'expression et l'impact de TIGIT sur les populations de LT CD8+ mémoires et innées.

Ce projet a permis d'étudier pour la première fois et de manière concomitante les lymphocytes iNKT et les LT CD8+ innés à différents stades de gammopathies monoclonales et en cas de traitement. Il s'agissait d'un travail prospectif et descriptif mené sur 33 patients. Compte tenu du faible effectif de patient, certains résultats manquent de significativité. Il sera donc nécessaire de poursuivre ce travail et d'étoffer notre cohorte avant de pouvoir tirer des conclusions définitives. Néanmoins, ces premiers résultats permettent d'entrevoir des pistes de réflexion dans le but de mieux comprendre la physiopathologie des gammopathies monoclonales.

De nombreuses perspectives s'ouvrent afin de faire suite à ce projet et un certain nombre d'analyses complémentaires se dessinent.

Tout d'abord et du fait d'un effectif trop faible nous n'avons pas pu travailler sur des échantillons de patients suivis pour un sMM. Or, le stade de myélome indolent constitue une étape cruciale dans l'évolution du stade MGUS au stade MM symptomatique. En ce sens

l'étude des populations lymphocytaires T innées chez ces patients pourraient s'avérer extrêmement informative.

D'autre part, et depuis quelques années, l'essor des immunothérapies (immunomodulateurs, anticorps anti-CD38, *CAR T cells*, BITEs...) a considérablement modifié la prise en charge des patients atteints de MM. Etant donné le faible effectif de notre population, il n'a pas été possible de réaliser une analyse statistique fiable concernant l'impact de ces immunothérapies sur nos populations d'intérêt. En effet, certains de ces traitements sont très peu représentés au sein de notre cohorte puisque seul 2 patients ont reçu du Daratumumab et aucun patient n'a bénéficié d'injection de *CAR T cells* ou de BITEs. Néanmoins, lorsque l'on s'intéresse aux patients traités par Lenalidomide ou par anticorps anti-CD38, nous avons le sentiment qu'il existe des variations phénotypiques, en particulier concernant les lymphocytes iNKT. Nous pouvons supposer que ces nouveaux traitements peuvent influencer de manière non négligeable le microenvironnement tumoral et le système immunitaire. En ce sens, il semble nécessaire de documenter nos populations d'intérêt (lymphocytes iNKT et LT CD8⁺ innés) après utilisation de ces immunothérapies innovantes.

Enfin, il serait intéressant, voire indispensable, de rechercher et étudier les lymphocytes iNKT et les LT CD8⁺ innés dans le compartiment médullaire. En effet, le MM est avant tout une maladie de la moelle osseuse et il semble donc indispensable d'étudier ce compartiment afin d'évaluer si nos observations sur sang périphérique reflètent le fonctionnement de la niche tumorale. Les premières analyses que nous avons menées sur la moelle osseuse en cas de MM nous ont permis d'identifier une population de LT CD8⁺ Eomes⁺ KIRs⁺ au niveau médullaire mais ces résultats demandent à être étoffés par une étude dédiée.

CONCLUSION

Cette étude a permis de décrire pour la première fois le rôle des lymphocytes T CD8⁺ innés et des lymphocytes iNKT dans l'évolution des gammopathies monoclonales.

Nos résultats suggèrent l'implication de ces deux populations cellulaires dans les remaniements immunitaires liés aux gammopathies monoclonales et ce dès le stade MGUS.

En cas de gammopathie monoclonale, les lymphocytes iNKT semblent altérés sur le plan quantitatif et phénotypique avec en particulier une perte partielle du compartiment DN.

S'agissant des LT CD8⁺ innés, ils semblent augmentés en cas de MGUS et de diagnostic de MM et non modifiés en cas de rechute et de RC par rapport aux donneurs sains. Quel que soit le stade de gammopathie monoclonale, il n'existe *a priori* ni déficit fonctionnel ni altération des capacités cytotoxiques des LT CD8⁺ innés.

A la différence de ce qui a pu être décrit dans d'autres modèles d'hémopathies malignes (exemple de la LMC), les LT CD8⁺ innés et les lymphocytes iNKT semblent intervenir indépendamment dans l'évolution des gammopathies monoclonales.

De fait, les variations quantitatives observées au sein des LT CD8⁺ innés semblent davantage liées à une reprogrammation des LT CD8⁺ mémoire qu'à l'existence d'un axe lymphocyte iNKT/LT CD8⁺innés. Cette reprogrammation semble se faire au dépend des LT CD8⁺ naïfs et au profit des autres compartiments de LT CD8⁺ mémoires selon une répartition hétérogène qui varie en fonction du stade de la gammopathie monoclonale.

Notre étude n'apporte pas toutes les réponses notamment concernant les mécanismes par lesquels ces populations interviennent dans l'évolution des gammopathies monoclonales et les étapes auxquelles elles participent. De nombreuses questions restent en attente et des analyses complémentaires seront nécessaires pour y répondre : analyse du stade sMM, évaluation de l'impact des immunothérapies, évaluation de la niche tumorale médullaire...

BIBLIOGRAPHIE

1. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Mayo Clin Proc.* janv 2003;78(1):21-33.
2. Van Nieuwenhuijzen N, Spaan I, Raymakers R, Peperzak V. From MGUS to Multiple Myeloma, a Paradigm for Clonal Evolution of Premalignant Cells. *Cancer Res.* 15 mai 2018;78(10):2449-56.
3. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* nov 2014;15(12):e538-48.
4. Calcinotto A, Ponzoni M, Ria R, Grioni M, Cattaneo E, Villa I, et al. Modifications of the mouse bone marrow microenvironment favor angiogenesis and correlate with disease progression from asymptomatic to symptomatic multiple myeloma. *Oncoimmunology.* juin 2015;4(6):e1008850.
5. Kyle RA, Larson DR, Dispenzieri A. Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med.* 2006;8.
6. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med.* 21 févr 2002;346(8):564-9.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* janv 2019;69(1):7-34.
8. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood.* 15 avr 2007;109(8):3489-95.
9. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 mai 2005;23(15):3412-20.
10. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 sept 2015;33(26):2863-9.
11. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia.* avr 2013;27(4):941-6.
12. Rajkumar SV, Larson D, Kyle RA. Diagnosis of smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med.* 4 août 2011;365(5):474-5.
13. Kastritis E, Mouloupoulos LA, Terpos E, Koutoulidis V, Dimopoulos MA. The prognostic importance of the presence of more than one focal lesion in spine MRI of patients with asymptomatic (smoldering) multiple myeloma. *Leukemia.* déc 2014;28(12):2402-3.

14. 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.* août 2016;17(8):e328-46.
15. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, Robillard N, Hulin C, Chretien M-L, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 06 2018;132(23):2456-64.
16. Moreau P, Hulin C, Macro M, Caillot D, Chaletteix C, Roussel M, et al. VTD is superior to VCD prior to intensive therapy in multiple myeloma: results of the prospective IFM2013-04 trial. *Blood.* 26 2016;127(21):2569-74.
17. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, Catalano J, Belch AR, Cavo M, et al. Lenalidomide and Dexamethasone in Transplant-Ineligible Patients with Myeloma. *N Engl J Med.* 4 sept 2014;371(10):906-17.
18. Attal M, Harousseau J-L, Stoppa A-M, Sotto J-J, Fuzibet J-G, Rossi J-F, et al. A Prospective, Randomized Trial of Autologous Bone Marrow Transplantation and Chemotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 11 juill 1996;335(2):91-7.
19. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol.* avr 2004;22(1):329-60.
20. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 25 août 2016;375(8):754-66.
21. Smith E, Prince M, Richardson P. ASCO 2019 | ICARIA MM: Isatuximab + pomalidomide + dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma: phase III results. 2019;6.
22. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2 mai 2019;380(18):1726-37.
23. Smith E. ASCO 2019 | AMG 420 rst-in-human phase I dose escalation study results. 2019;5.
24. Tamura H. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple myeloma. *Int J Hematol.* mars 2018;107(3):278-85.
25. Pratt G, Goodyear O, Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol.* sept 2007;138(5):563-79.
26. Rawstron AC, Davies FE, Owen RG, English A, Pratt G, Child JA, et al. B-lymphocyte suppression in multiple myeloma is a reversible phenomenon specific to normal B-cell progenitors and plasma cell precursors. *Br J Haematol.* janv 1998;100(1):176-83.
27. Rossjohn J, Pellicci DG, Patel O, Gapin L, Godfrey DI. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat Rev Immunol.* déc 2012;12(12):845-57.
28. Nair S, Dhodapkar MV. Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 22 sept 2017;8:1178.

29. Dhodapkar MV, Geller MD, Chang DH, Shimizu K, Fujii S-I, Dhodapkar KM, et al. A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma. *J Exp Med*. 16 juin 2003;197(12):1667-76.
30. Berg RE, Cordes CJ, Forman J. Contribution of CD8⁺ T cells to innate immunity: IFN- γ secretion induced by IL-12 and IL-18. *Eur J Immunol*. oct 2002;32(10):2807-16.
31. Jacomet F, Cayssials E, Basbous S, Levescot A, Piccirilli N, Desmier D, et al. Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8⁺ KIR/NKG2A⁺ T cells in human adults and cord blood samples. *Eur J Immunol*. 1 juill 2015;45(7):1926-33.
32. Barbarin A, Cayssials E, Jacomet F, Nunez NG, Basbous S, Lefèvre L, et al. Phenotype of NK-Like CD8(+) T Cells with Innate Features in Humans and Their Relevance in Cancer Diseases. *Front Immunol*. 2017;8:316.
33. Jacomet F, Cayssials E, Barbarin A, Desmier D, Basbous S, Lefèvre L, et al. The Hypothesis of the Human iNKT/Innate CD8(+) T-Cell Axis Applied to Cancer: Evidence for a Deficiency in Chronic Myeloid Leukemia. *Front Immunol*. 2016;7:688.
34. Muhammad Ali Tahir S, Cheng O, Shaulov A, Koezuka Y, Bublely GJ, Wilson SB, et al. Loss of IFN- γ Production by Invariant NK T Cells in Advanced Cancer. *J Immunol*. 1 oct 2001;167(7):4046-50.
35. Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(α)24 natural killer T cells. *J Exp Med*. 4 mars 2002;195(5):637-41.
36. Richter J, Neparidze N, Zhang L, Nair S, Monesmith T, Sundaram R, et al. Clinical regressions and broad immune activation following combination therapy targeting human NKT cells in myeloma. *Blood*. 17 janv 2013;121(3):423-30.
37. Chung DJ, Pronschinske KB, Shyer JA, Sharma S, Leung S, Curran SA, et al. T-cell Exhaustion in Multiple Myeloma Relapse after Autotransplant: Optimal Timing of Immunotherapy. *Cancer Immunol Res*. 1 janv 2016;4(1):61-71.
38. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, Scott EC, Halwani A, Gutierrez M, et al. Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. *J Clin Oncol*. 10 août 2016;34(23):2698-704.
39. Manieri NA, Chiang EY, Grogan JL. TIGIT: A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle. *Trends Immunol*. janv 2017;38(1):20-8.
40. Guillerey C, Harjunpää H, Carrié N, Kassem S, Teo T, Miles K, et al. TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8⁺ T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood*. 18 oct 2018;132(16):1689-94.

ANNEXES

Stage	Criteria	Median Survival (months)
I	Serum β_2 -microglobulin < 3.5 mg/L Serum albumin \geq 3.5 g/dL	62
II	Not stage I or III*	44
III	Serum β_2 -microglobulin \geq 5.5 mg/L	29

*There are two categories for stage II: serum β_2 -microglobulin < 3.5 mg/L but serum albumin < 3.5 g/dL; or serum β_2 -microglobulin 3.5 to < 5.5 mg/L irrespective of the serum albumin level.

Figure 16. Score ISS, Greip et al, JCO 2005

Prognostic Factor	Criteria
ISS stage	
I	Serum β_2 -microglobulin < 3.5 mg/L, serum albumin \geq 3.5 g/dL
II	Not ISS stage I or III
III	Serum β_2 -microglobulin \geq 5.5 mg/L
CA by iFISH	
High risk	Presence of del(17p) and/or translocation t(4;14) and/or translocation t(14;16)
Standard risk	No high-risk CA
LDH	
Normal	Serum LDH < the upper limit of normal
High	Serum LDH > the upper limit of normal
A new model for risk stratification for MM	
R-ISS stage	
I	ISS stage I and standard-risk CA by iFISH and normal LDH
II	Not R-ISS stage I or III
III	ISS stage III and either high-risk CA by iFISH or high LDH

Abbreviations: CA, chromosomal abnormalities; iFISH, interphase fluorescent in situ hybridization; ISS, International Staging System; LDH, lactate dehydrogenase; MM, multiple myeloma; R-ISS, revised International Staging System.

Figure 17. Score R-ISS, Palumbo et al, JCO 2015

ANNEXES

Fonction	Anticorps	Fluorochrome	Référence	Fournisseur	Localisation
LT CD8 innés	TCR $\alpha\beta$	BV421	306722	BioLegend	Membranaire
	TCR $\alpha\beta$	BV510	306734	BioLegend	Membranaire
	CD8	PeCy7	557746	BD Biosciences	Membranaire
	NKG2A	PE	130113566	Miltenyi	Membranaire
	KIR2D	PE	130092688	Miltenyi	Membranaire
	KIR3DL1-DL2	PE	130095205	Miltenyi	Membranaire
	Eomes	eFluor660	50487742	eBioscience	Intracellulaire
	Eomes	PerCp eF710	46487742	eBioscience	Intracellulaire
Phénotype mémoire	CD45RA	BV510	304142	BioLegend	Membranaire
	CCR7	PerCpCy5.5	353220	BioLegend	Membranaire
	CD57	FITC	322306	BioLegend	Membranaire
Fonction cytotoxique	Perforine	FITC	556577	BD Biosciences	Intracellulaire
	IFN γ	AF488	502515	BioLegend	Intracellulaire
Marqueurs d'exhaustion	PD1	APC	329908	BioLegend	Membranaire
	TIM3	BV421	565563	BD Biosciences	Membranaire
Lymphocytes iNKT	TCR V α 24-J α 18 (6B11)	APC	342908	BioLegend	Membranaire
	CD3	BV421	300434	BioLegend	Membranaire
	PLZF	PE	12932082	eBioscience	Intracellulaire
	CD4	FITC	300506	BioLegend	Membranaire
	CD8	PeCy7	557746	BD Pharmingen	Membranaire
Marqueurs NK	CD161	PerCpCy5.5	339908	BioLegend	Membranaire
	CD56	BV510	563041	BioLegend	Membranaire

Tableau 6. Liste des anticorps utilisés pour immunomarquage.

Panel iNKT	Panel LT CD8+ innés (1)	Panel LT CD8+ innés (2)	Panel LT CD8+ innés (3)
Zombi NIR en APC-Cy7	Zombi NIR en APC-Cy7	Zombi NIR en APC-Cy7	Zombi NIR en APC-Cy7
CD3 en BV421	TCR $\alpha\beta$ en BV421	TCR $\alpha\beta$ en BV510	TCR $\alpha\beta$ en BV421
6B11 en APC	CD8 en PeCy7	CD8 en PeCy7	CD8 en PeCy7
CD4 en FITC	Kirs en PE	Kirs en PE	Kirs en PE
CD8 en PeCy7	CD45RA en BV410	PD-1 en APC	CD45RA en BV410
CD161 en PerCpCy5.5	CCR7 en PerCpCy5.5	TIM3 en BV421	CCR7 en PerCpCy5.5
CD56 en BV510	CD57 en FITC	Perforine en FITC	IFN γ en AF488
PLZF en PE	Eomes en ef660	Eomes en PerCpPeF710	Eomes en ef660

Tableau 7. Description des 4 panels d'anticorps utilisés pour l'immunomarquage.

ANNEXES

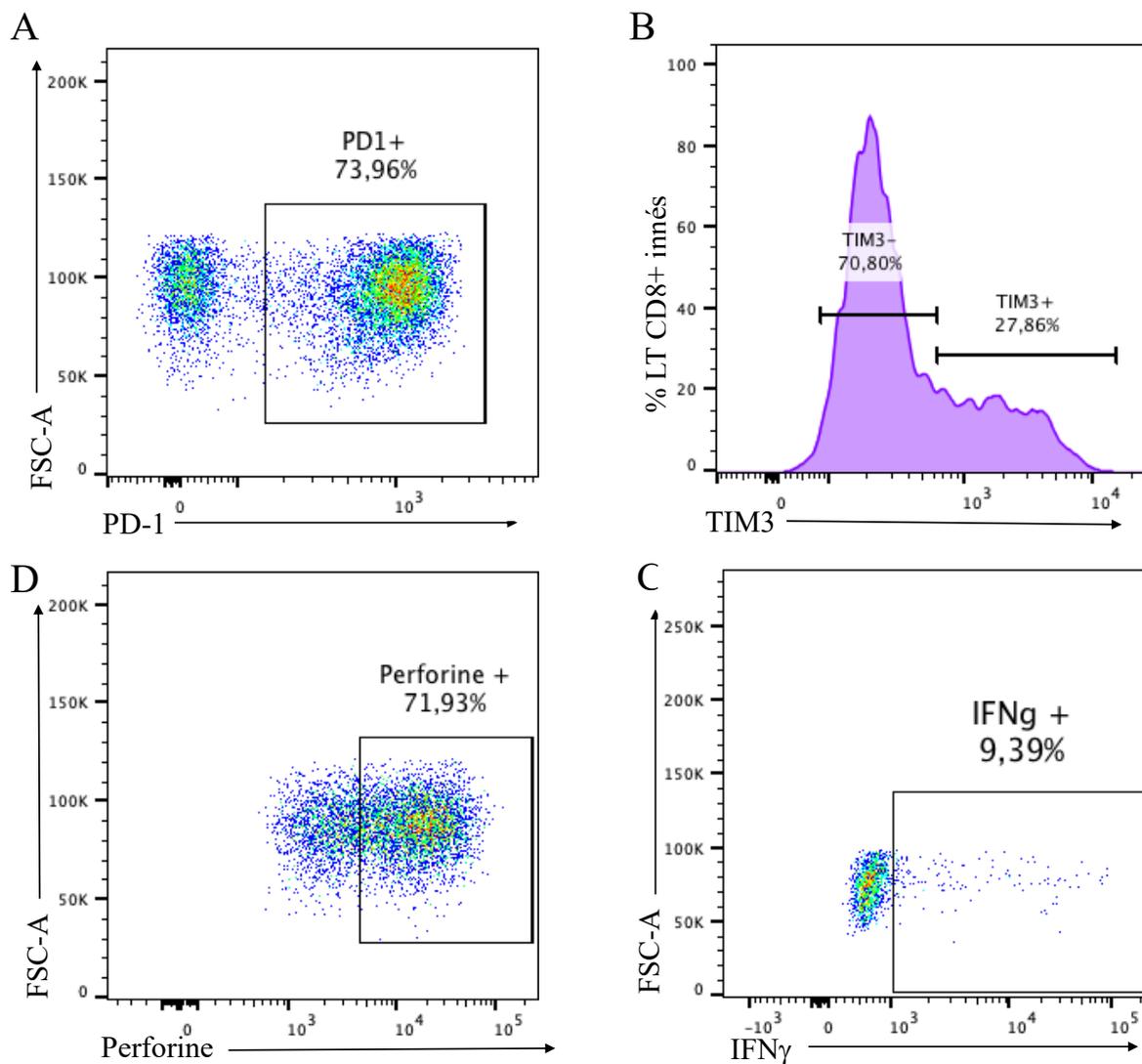


Figure 18. Exemple de marquage de PD-1 (A), TIM3 (B), Perforine (C) et IFN γ (D) en cytométrie en flux

RESUME

Introduction. Les gammopathies monoclonales sont un groupe de maladies caractérisées par la prolifération médullaire de plasmocytes tumoraux et au sein desquelles il existe un *continuum* évolutif qui s'étend d'un stade précancéreux ou MGUS (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*) au stade cancer ou myélome multiple (MM). Dans cette étude nous rapportons les résultats concernant deux populations lymphocytaires T innées : les lymphocytes iNKT et les lymphocyte T (LT) CD8+ innés.

Matériel et méthode. Ce travail porte sur 33 patients : 9 MGUS, 8 MM au diagnostic (NDMM), 8 MM en rechute, 8 patients en réponse complète (ou RC) et 18 donneurs sains (DS). Nos populations sont identifiées après immunomarquage et analyse en cytométrie en flux.

Résultats. L'âge médian de la cohorte est de 65 ans (41 – 90) avec un sexe ratio H/F à 1,2. Concernant les lymphocytes iNKT, leur fréquence a tendance à diminuer dans tous les sous-groupes de gammopathies monoclonales, dès le stade MGUS. D'autre part, la proportion de lymphocytes iNKT double négatif (DN) semble également diminuée dans les sous-groupes MGUS ($29,97 \pm 7,58\%$; $p=0,0072$), NDMM ($45,99 \pm 7,82\%$), rechute ($42,6 \pm 6,52\%$) et RC ($38,08 \pm 7,65\%$; $p=0,0921$) par rapport au groupe DS ($67,9 \pm 5,55\%$). S'agissant des lymphocytes T CD8+ innés, nous observons, dans les sous-groupes MGUS et NDMM, une augmentation de leur fréquence (respectivement $14,59 \pm 3,11\%$; $p=0,0517$ et $15,22 \pm 2,43\%$; $p=0,0168$) par rapport aux DS ($5,51 \pm 1,24\%$). Au sein de ces mêmes sous-groupes, il semble que la proportion de LT CD8+ innés exprimant le phénotype mémoire EMRA (CD45RA+ CCR7- CD57+) soit augmentée (respectivement $66,72 \pm 5,71\%$ et $65,47 \pm 8,72\%$) en comparaison avec les DS ($48,53 \pm 4,99\%$). Parallèlement, nous observons une diminution des LT CD8+ naïfs en cas de NDMM ($20,63 \pm 4,29\%$), de rechute ($17,04 \pm 5,61\%$) et de RC ($8,25 \pm 4,35\%$) par rapport au MGUS ($35,95 \pm 5,33\%$) et aux DS.

Conclusion. En cas de gammopathie monoclonale, les lymphocytes iNKT semblent altérés sur le plan quantitatif et phénotypique avec en particulier une perte partielle du compartiment DN. S'agissant des LT CD8+ innés, ils ont tendance à être augmentés en cas de MGUS et de NDMM sans déficit fonctionnel. Ces anomalies semblent s'inscrire dans une reprogrammation globale des LT CD8+ mémoires aux dépens des LT naïfs.

Mots clés : lymphocytes TCR $\alpha\beta$ innés, lymphocytes iNKT, lymphocytes T CD8+ innés, gammopathie monoclonale, myélome multiple.



SERMENT



En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

