

## L'expression de l'IL6-R par les plasmocytes influe-t-elle la réponse au traitement d'induction au cours du myélome multiple ?

Ines Safra<sup>1</sup>, Saloua Ladeb<sup>2</sup>, Nour Skouri<sup>3</sup>, Slah Ouerhani<sup>1</sup>, Amina Ben Amor<sup>1</sup>, Samia Menif<sup>1</sup>, Amel Lakhal<sup>2</sup>, Lamia Torjemane<sup>2</sup>, Tarek Ben Othman<sup>2</sup>, Abdeladhim Ben Abdelahim<sup>2</sup>, Melika Ben Ahmed<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Université Tunis El Manar, Faculté de Médecine Tunis, Institut Pasteur Tunis, Laboratoire d'Hématologie moléculaire et cellulaire, Tunis, Tunisie ;

<sup>2</sup>Université Tunis El Manar, Faculté de Médecine Tunis, Centre national de greffe de moelle osseuse, Tunis, Tunisie ;

<sup>3</sup>Université Tunis El Manar, Faculté de Médecine Tunis, Institut Pasteur Tunis, Laboratoire d'Immunologie, Tunis, Tunisie ;

*I. Safra, S. Ladeb, N. Skouri, S. Ouerhani, A. Ben Amor, S. Menif, A. Lakhal, L. Torjemane, T. Ben Othman, A. Ben Abdelahim, M. Ben Ahmed*

*I. Safra, S. Ladeb, N. Skouri, S. Ouerhani, A. Ben Amor, S. Menif, A. Lakhal, L. Torjemane, T. Ben Othman, A. Ben Abdelahim, M. Ben Ahmed*

L'expression de l'IL6-R par les plasmocytes influe-t-elle la réponse au traitement d'induction au cours du myélome multiple ?

Does multiple myeloma response induction therapy depending on plasma cell il6 receptor gene expression

LA TUNISIE MEDICALE - 2013 ; Vol 91 (n°05) : 337-341

LA TUNISIE MEDICALE - 2013 ; Vol 91 (n°05) : 337-341

### R É S U M É

**Prérequis :** L'interleukine 6 (IL6) est considérée comme un principal facteur de survie et de croissance des plasmocytes malins au cours du myélome multiple.

**But :** L'objectif de notre travail est d'analyser l'expression du gène du récepteur de l'IL6 (IL6-R) par les plasmocytes malins comparativement à celle des plasmocytes normaux.

**Méthodes :** L'étude a porté sur 47 échantillons médullaires de Patients au diagnostic et 16 témoins sains donneurs de moelle osseuse. L'analyse de l'expression du gène IL-6R par PCR quantitative en temps réel et en utilisant la technologie Taqman a été effectuée sur des plasmocytes isolés et quantifiée par le calcul de la valeur 2-ΔCT.

**Résultats :** L'expression de IL6-R corrélait négativement avec le degré de réponse au traitement (p=0,02). L'expression du gène IL-6R paraît déterminante dans l'évaluation de la qualité de réponse au traitement. Ainsi,

**Conclusion :** L'analyse des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de ce gène par les plasmocytes malins peut amener à une meilleure compréhension de la physiopathogénie de l'oncogénèse et des mécanismes de résistance au traitement et ouvrir des perspectives d'essais thérapeutiques ciblés.

### S U M M A R Y

**Background:** Interleukine 6 (IL-6) is the most important cytokine involved in malignant plasma cells growth and survival.

**Aim:** To analyse bone marrow plasma cells IL6 receptor gene expression in both multiple myeloma patients at diagnosis and healthy bone marrow donors.

**Methods:** Clinical and biological patients' features and responses to Dexamethasone-Thalidomide induction therapy were gathered. 47 patients and 16 case controls were analyzed: Bone marrow plasma cells were isolated; and IL6 receptor gene expression was quantified using Taqman quantitative PCR technology and 2-ΔCT formula.

**Results:** Quantitative and qualitative IL6 receptor gene expression were negatively correlated with the degree of response to therapy (p = 0.02). In this study, plasma cells IL6 receptor gene expression seems to be decisive in predicting the response to treatment.

**Conclusion:** Understanding the mechanisms involved in plasma cells IL6 receptor gene expression may offer a better appreciation of the physiopathologic and anti-oncogenic ways of drug resistance in multiple myeloma and consequently the discovery of new specific drugs.

### M o t s - c l é s

Myélome multiple, PCR en temps réel, oncogénèse, résistance au traitement, cytokines.

### Key - w o r d s

Multiple myeloma, Quantitative PCR, oncogenesis, treatment resistance, cytokines.

Le Myélome Multiple (MM) est une hémopathie maligne qui se définit par une expansion plasmocytaire au niveau de la moelle osseuse dépassant 10% (1). La transformation tumorale est initiée au niveau des organes lymphoïdes périphériques, au cours du processus de réarrangement des gènes des immunoglobulines. Le plasmocyte malin migre vers la moelle osseuse où il trouve l'environnement favorable à sa prolifération au dépend des cellules normales de l'hématopoïèse. La synthèse d'une panoplie de cytokines par l'environnement médullaire et par les cellules plasmocytaires accompagne l'évolution de la maladie (2). Un des acteurs essentiels dans la survie et la prolifération des plasmocytes malins est l'interleukine-6 (IL6) (3).

L'objectif de notre travail est d'analyser l'expression du gène du récepteur de l'IL6 (IL6-R) par les plasmocytes malins au diagnostic et d'établir une corrélation avec les données clinico-biologiques ainsi que la réponse au traitement d'induction par Dexaméthasone-Thalidomide.

## PATIENTS ET MÉTHODES

Il s'agit d'une étude prospective qui a porté sur les échantillons médullaires de 47 patients ayant un MM, étudiés au diagnostic et de 16 témoins (donneurs sains de moelle osseuse).

L'ensemble de nos patients ont reçu un traitement d'induction selon le protocole national Thalidomide-Dexaméthasone. Une évaluation est faite à la fin du traitement (3 mois), en appréciant la diminution du composant monoclonal sérique ou de l'excrétion urinaire des chaînes légères pour les cas de myélome à chaînes légères. Le type de réponse au traitement a été évalué selon les critères IMWG (international myeloma work group). Quatre groupes différents ont été individualisés; « échec de réponse », « réponse partielle », « très bonne réponse partielle » et « réponse complète ».

L'analyse des plasmocytes médullaires isolés et identifiés par cytométrie en flux a consisté en une séparation des cellules mononucléées, suivi d'un tri magnétique des plasmocytes, puis d'une extraction de l'ARN, rétro-transcription en ADNc (ADN complémentaire) et enfin une analyse de l'expression du gène IL-6R par PCR quantitative en temps réel et en utilisant la technologie Taqman. L'extraction de l'ARN total à partir des plasmocytes triés a été effectuée à l'aide du kit RNeasy kit (Qiagen). La transcription inverse a été réalisée en rajoutant la transcriptase inverse Murine-Moloney leukemia virus reverse Transcriptase, Gibco BRL (MMLV) à 10 UI/ $\mu$ l, son tampon 1X, du DTT à 0,01M, des dNTP à 0,5mM et de la RNase out (Invitrogen). La quantification des ARNm par la technique RT-PCR en temps réel a été effectuée selon la technologie Taqman. La quantité d'ARNm de chaque gène a été exprimée en unité arbitraire (UA) en calculant la valeur  $2^{-\Delta CT}$ . Le gène de référence choisi a été RPLPO. L'amplification a été réalisée dans un thermocycler ABI PRISM 7700, en 40 cycles de 15 secondes de dénaturation à 95°C et d'une minute d'hybridation et d'extension à 60°C. L'analyse des résultats a été effectuée grâce au logiciel Séquence Detector V.1.6.3. Les amorces ont été fournies par les kits « TaqMan Gene expression Assays de

Applied biosystems ».

Les tests statistiques ont été réalisés grâce aux logiciels SPSS et StatView. L'analyse comparative des niveaux d'expression du gène IL6-R entre le groupe des patients atteints de myélome multiple avant et après traitement et les donneurs sains a été réalisée par le test non paramétrique de Mann-Whitney. L'analyse comparative des pourcentages d'individus présentant une diminution de l'expression du gène IL6-R entre les différents sous-groupes identifiés a été réalisée par le test de Chi-deux. La corrélation entre l'expression quantitative et qualitative du gène IL6-R avec le degré de réponse au traitement a été analysée respectivement par le coefficient de corrélation de rang de Spearman et le test de Mann-Whitney. L'expression du gène IL6-R en fonction de la qualité de réponse au traitement a été analysée par le test de Fisher. La signification statistique a été attribuée aux valeurs de p inférieures à 0,05.

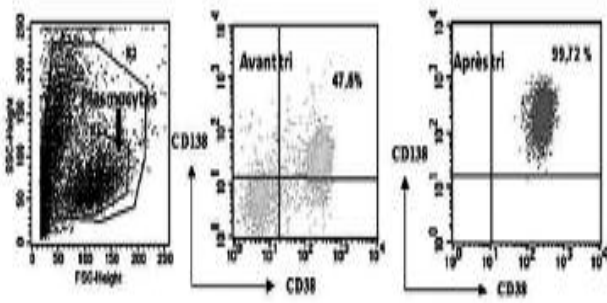
## RÉSULTATS

Les caractéristiques épidémiologiques des groupes patients et témoins ainsi que les caractéristiques clinico-biologiques du myélome au diagnostic sont présentées (Tableau 1). Le tri plasmocytaire vérifié par cytométrie en flux (CMF) correspondant aux cellules double positives CD138 et CD38 a permis d'obtenir une pureté supérieure à 95% pour tous les échantillons obtenus. (Figure 1). L'amplification du gène IL-6R et du gène de référence RPLPO testée en condition Taqman a été d'efficacité optimale. L'écart des CT étant pour les deux gènes d'environ 3,3.

**Tableau 1** : Caractéristiques épidémiologiques et clinico-biologiques :

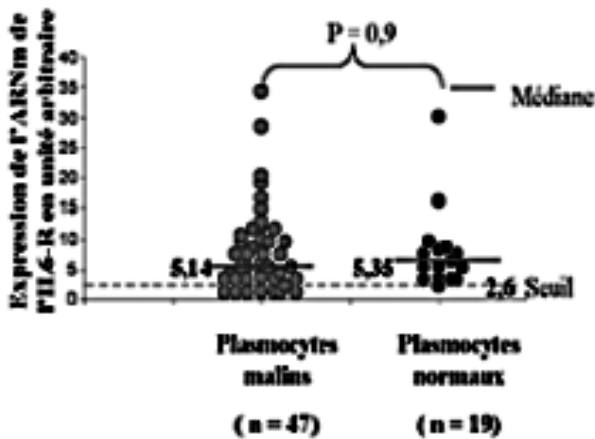
		Patients (n = 47)	Témoins (n = 16)
<b>Age</b>		52	41
<b>Sexe ratio</b>		1.5	1.5
<b>Type de myélome</b>	<b>IgG</b>	66%	
	<b>IgA</b>	19%	
	<b>CL</b>	15%	
<b>Stade du myélome</b>	<b>IIIa</b>	77%	
	<b>IIIb</b>	13%	
<b>Infiltration plasmocytaire médullaire</b>	<b>&gt;20%</b>	83%	
	<b>&gt;30%</b>	58%	
<b>Score ISS</b>	<b>1</b>	31%	
	<b>2</b>	31%	
	<b>3</b>	38%	
<b>Réponse après induction</b>	<b>RC</b>	20%	
	<b>TBRP</b>	6%	
	<b>RP</b>	58%	
	<b>Echec</b>	16%	

**Figure 1 :** Analyse par CMF de la pureté des plasmocytes triés



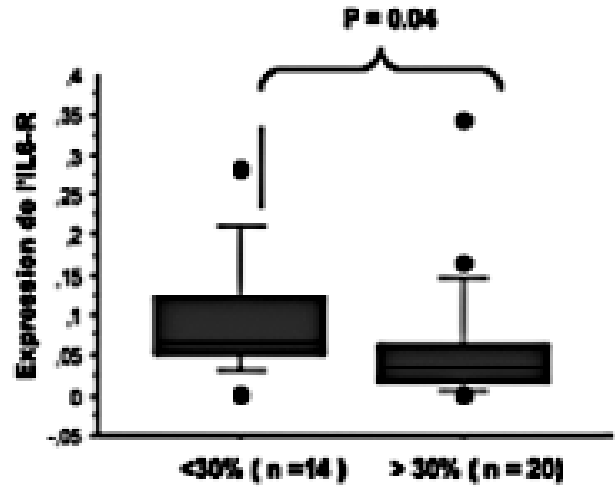
L'analyse comparative de l'expression du gène IL6-R par rapport à celle des donneurs sains n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes. (Médiane : 5,14 vs 5,35 ; p = 0,9) (Figure 2).

**Figure 2 :** Expression de l'IL6-R dans les plasmocytes malins et normaux.



En fixant le seuil d'une expression normale de l'IL-6R à la valeur du 5ème percentile obtenue dans le groupe des contrôles sains, on note que le profil d'expression du gène IL6-R est très hétérogène chez les patients. Il est en effet diminué chez 11 patients atteints de MM et normal ou augmenté chez les 36 autres. L'analyse comparative de l'expression du gène IL6-R selon le score ISS ( 1, 2 ou 3), le type de MM, la calcémie, l'albuminémie, le dosage de la bêta 2 microglobuline ou la valeur du pic initial à l'EPP n'a pas montré de corrélation significative (Tableau 2). L'analyse des niveaux d'expression du gène IL6-R selon le degré d'envahissement de la moelle osseuse à une valeur seuil de 30% réalisée chez 34 patients, a révélé de façon intéressante qu'une infiltration de plus de 30% est significativement associée à un niveau faible d'expression du gène IL-6R (p = 0,04 )(Figure 3).

**Figure 3 :** Expression d'IL6-R selon le degré d'infiltration médullaire.



**Tableau 2 :** Corrélation Expression de l'IL6-R et caractéristiques du myélome

Paramètres du myélome	Corrélation avec expression :IL6-R
Score ISS	X2 = 1.27, p = 0.53
Type de myélome	X2 = 7.11, p = 0.21
Calcémie	rho= -0.14 , p= 0.45
Albuminémie	rho= -0.29 , p= 0.13
B2 microglobuline	rho= 0.21 , p= 0.23
Pic initial à l'EPP	rho= -0.20 , p= 0.25

X2 : Test Chi-deux ; rho : coefficient de corrélation de rang de Spearman ; p : signification statistique.

La réponse au traitement a été évaluée après 3 mois chez 36 patients, 7 parmi eux ont présenté une réponse complète. Plusieurs types d'analyses statistiques ont été réalisées afin d'étudier la présence d'une éventuelle corrélation entre l'expression du gène IL6-R et la réponse au traitement.

- L'analyse du profil de la réponse au traitement en fonction du niveau d'expression de l'IL6-R est présentée. (Tableau 3). Elle montre que l'hypoexpression de l'IL6-R est un facteur prédictif d'une bonne réponse au traitement (p = 0,006 ; intervalle de confiance = 95% [1,75-32,7]).

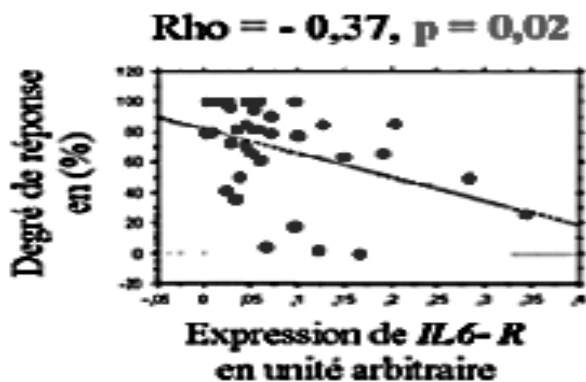
**Tableau 3 :** Analyse de l'expression de l'IL-6R en fonction de la réponse au traitement

Expression IL6R	répondeurs (n=7)	non (n=29)
diminuée*	5	4
augmentée*	2	25

\* selon une valeur seuil qui correspond au 5ème percentile de son expression par les témoins  
p = 0,006 selon le test de Fisher ;  
Intervalle de confiance = 95% [1,75-32,17]

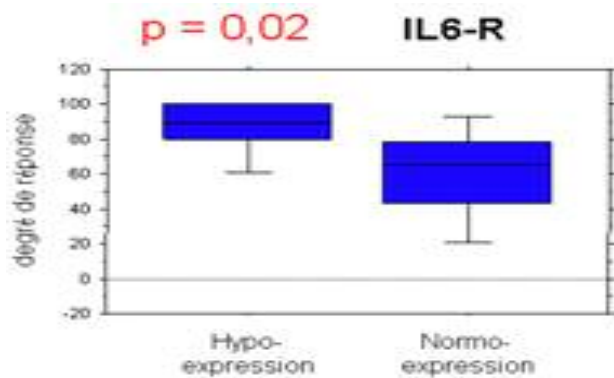
- L'analyse comparant la présence d'une corrélation entre les niveaux d'expression du gène IL6-R et la réponse au traitement a démontré que celle-ci corrélait négativement avec le degré de réponse au traitement ( $p=0,02$ ). Plus le niveau d'expression de l'IL6-R était bas, plus la réponse au traitement était élevée (Figure 4).

**Figure 4 :** Corrélation négative entre l'expression de l'IL6-R et le degré de réponse au traitement.



- L'analyse du degré de réponse au traitement chez les patients atteints de MM stratifiée selon une expression normale ou diminuée de l'IL6-R a montré que le degré de réponse au traitement est significativement plus élevé chez les patients présentant une hypoeexpression de l'IL6-R ( $p = 0.02$ ) (Figure 5).

**Figure 5 :** Corrélation entre l'expression de l'IL6-R et la réponse au traitement.



## DISCUSSION

L'environnement médullaire en interaction avec les cellules plasmocytaires a une grande importance dans la biologie du myélome multiple. Du fait de ces interactions, de nombreux facteurs de croissance sont produits et impliqués dans la progression du clone tumoral (2).

L'IL-6 est la première et principale cytokine jouant le rôle d'un facteur de croissance dans le myélome. Elle est synthétisée par les cellules du microenvironnement : cellules stromales,

ostéoclastes et ostéoblastes, mais également par les cellules plasmocytaires elles-mêmes. Elle interagit d'une façon autocrine et paracrine avec les plasmocytes malins via son récepteur et joue un rôle majeur dans l'activation, la prolifération et la survie des cellules néoplasiques (4). L'IL-6 est un puissant stimulant des plasmocytes tumoraux en culture (5). Aux stades avancés de la maladie, les taux d'IL-6 dans le sang sont augmentés (3). En dépit du rôle non discuté et inductible de l'IL-6 dans la physiopathologie du myélome multiple, les données rapportées par notre étude ne montrent pas de différence d'expression de l'IL6-R par les plasmocytes malins par rapport à celle des donneurs sains. Ces résultats corroborent avec ceux de Seon Young Kim et al (6) qui ont montré que la quantification par FISH de l'IL6-R était comparable à celle des sujets normaux chez 44.8% des patients atteints de myélome multiple au diagnostic. La transformation maligne des plasmocytes ne semble pas nécessiter une augmentation de l'expression de l'IL-6R. Ceci est en accord avec l'intérêt reconnu de l'IL-6 dans la survie et la prolifération de la population plasmocytaire qu'elle soit normale ou maligne. Dans notre étude, l'expression du gène IL-6R diminue lorsque le taux de plasmocytes médullaires augmente, ceci peut être expliqué par le fait que son profil d'expression chez les patients atteints de myélome est soumis à une régulation autocrine. L'inhibition de l'expression du gène IL-6R résulterait d'une anomalie qui apparaîtrait secondairement durant l'évolution de la maladie. Celle-ci serait responsable de la progression de la maladie et ce, à l'instar des mutations évolutives (mutations de Ras, par exemple) et qui s'associent aux stades agressifs de la maladie (7). Il est rapporté que les taux sériques d'IL-6 et d'IL-6R sont des facteurs pronostiques du myélome multiple et sont le reflet de la fraction proliférante des cellules tumorales chez les patients (8-9). Il est intéressant de noter que chez certains des patients de cette série, l'expression du gène IL6-R est très augmentée. Cette augmentation a été déjà décrite comme un facteur de mauvais pronostic. Il semblerait que cette expression accrue pourrait favoriser l'échappement de la cellule tumorale aux thérapeutiques anti-tumorales. Seon Young Kim et al (6) ont montré que l'augmentation de l'IL6-R quantifiée par FISH chez les patients présentant un myélome multiple est un facteur pronostic déterminant dans la réponse au traitement par autogreffe. Barillé S et al (10) ont montré que les plasmocytes tumoraux expriment le récepteur de l'IL6 et que son expression augmente parallèlement avec l'évolution de la maladie. D'ailleurs dans notre travail, nous avons trouvé que les patients meilleurs répondeurs au traitement Dexaméthasone-Thalidomide correspondent à ceux qui présentent une hypoeexpression du gène IL-6R au départ. Ceci suggère que l'augmentation de l'expression de l'IL-6R au diagnostic s'accompagne d'un échappement et d'une résistance au traitement Dexaméthasone-Thalidomide, et renforce l'intérêt de l'évaluation de l'expression de l'IL-6R dans la stratification pronostique des patients atteints de myélome multiple. Cette Stratification pourrait orienter le choix de thérapeutiques ciblées. Des stratégies visant à bloquer l'IL-6 ont été développées en utilisant soit des anticorps anti-IL-6 ou anti-IL-6R soit un antagoniste de l'IL-6 (Sant7) (11).

---

### CONCLUSION

---

L'expression du gène IL-6R paraît déterminante dans l'évaluation de la qualité de réponse au traitement. Ainsi,

L'analyse des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de ce gène par les plasmocytes malins peut amener à une meilleure compréhension de la physiopathogénie de l'oncogénèse et des mécanismes de résistance au traitement et ouvrir des perspectives d'essais thérapeutiques ciblés.

### Références

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23:3-9.
2. Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 2001;20:5991-6000.
3. Klein B, Zhang XG, Lu ZY, Bataille R. Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* 1995;85:863-72.
4. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1-20.
5. Klein B, Zhang XG, Jourdan M, et al. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* 1989;73:517-26.
6. Seon Young Kim, Hyun Jung Min, alHyun Kyung Park Increased copy number of the interleukin-6 receptor gene is associated with adverse survival in multiple myeloma patients treated with autologous stem cell transplantation *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17 : 810-20.
7. Seidl S, Kaufmann H, Drach J. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2003;4:557-64.
8. Gaillard JP, Bataille R, Brailly H, et al. Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *Eur J Immunol* 1993;23:820-4.
9. Ludwig H, Nachbaur DM, Fritz E, Krainer M, Huber H. Interleukin-6 is a prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 1991;77:2794-5.
10. Barillé S, Collette M, Bataille R, Amiot M. Myeloma cells up regulate interleukin-6 secretion in osteoblastic cells through cell-to-cell contact but down regulate osteocalcin. *Blood*. 1995;86:3151-9.
11. Tassone P, Neri P, Burger R, et al. Combination therapy with interleukin-6 receptor superantagonist Sant7 and dexamethasone induces antitumor effects in a novel SCID-hu In vivo model of human multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2005;11:4251-8.