

# UNIVERSITE DE LIMOGES

## Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2014

THÈSE N°

### **ETUDE RETROSPECTIVE DE LA MUTATION L265P DE MYD88 ET DU SUIVI DE 26 CAS DE LYMPHOCYTOSE B MONOCLONALE AU CHU DE LIMOGES ENTRE 2005 ET 2012**

Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale  
tenant lieu de thèse pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie

présenté et soutenu publiquement

le 4 juillet 2014

par

Nicolas LECHEVALIER

né le 8 août 1987 à Essey-lès-Nancy

#### Examineurs de la thèse

M. le Professeur Gilles Dreyfuss .....Président  
M. le Professeur Jean-Luc Duroux ..... Juge  
M. le Professeur Jean-Louis Beneytout ..... Juge  
M. le Professeur Jean Feuillard ..... Juge  
Mme le Docteur Nataliya Dmytruk ..... Membre invité  
M. le Docteur Franck Trimoreau ..... Directeur de thèse

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1<sup>er</sup> VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

2<sup>ème</sup> VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

**PROFESSEURS** :

<b>BENEYTOU</b> Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>BOTINEAU</b> Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>BROSSARD</b> Claude	PHARMACOTECHNIE
<b>BUXERAUD</b> Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>DELAGE</b> Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
<b>DESMOULIERE</b> Alexis	PHYSIOLOGIE
<b>DREYFUSS</b> Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>MAMBU</b> Lengo	PHARMACOGNOSIE
<b>LOUDART</b> Nicole	PHARMACOLOGIE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOSTATISTIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACOTECHNIE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES** :

<b>LACHATRE</b> Gérard	TOXICOLOGIE
<b>MOESCH</b> Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
<b>ROGEZ</b> Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE

**MAITRES DE CONFERENCES** :

<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
----------------------------	-----------------------------------

<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BEAUBRUN-GIRY</b> Karine	PHARMACOTECHNIE
<b>BILLET</b> Fabrice	PHYSIOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>CLEDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>COURTIOUX</b> Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
<b>DELEBASSEE</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>DEMIOT</b> Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>JAMBUT</b> Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>LABROUSSE</b> Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
<b>LEGER</b> David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>LOTFI</b> Hayat	TOXICOLOGIE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MILLOT</b> Marion	PHARMACOGNOSIE
<b>MOREAU</b> Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>POUGET</b> Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>SIMON</b> Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>VIGNOLES</b> Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

**PROFESSEUR :**

<b>ROUMIEUX</b> Gwenhaël	ANGLAIS
--------------------------	---------

**ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :**

<b>IMBERT</b> Laurent	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
-----------------------	-----------------------------------

## Remerciements

---

**A Monsieur le Professeur Gilles Dreyfuss,**

Je vous remercie de la gentillesse avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail et de présider ce jury.

Veillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et mes plus sincères remerciements.

**A Monsieur le Professeur Jean-Luc Duroux,**

Je vous suis très reconnaissant de me faire l'honneur de composer ce jury et d'avoir accepté de juger ce travail.

Croyez en l'expression de mon plus grand respect.

**A Monsieur le Professeur Jean-Louis Beneytout,**

Je vous remercie d'avoir accepté de prendre part à ce jury et de toute l'attention que vous voudrez porter à ce travail.

Veillez trouver ici le témoignage de ma très profonde gratitude.

**A Monsieur le Professeur Jean Feuillard,**

Je vous remercie pour votre aide et vos inspirations lors de ce travail. Je vous remercie également pour ces deux semestres mémorables dans votre service ainsi que pour tout ce que vous m'avez enseigné et apporté. Ce fut un réel plaisir d'être à vos côtés durant les séances de cytologie et de cytométrie.

**A Madame le Docteur Nataliya Dmytruk,**

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury et de juger ce travail avec votre expertise en hématologie clinique.

Veillez trouver ici le témoignage de mon plus grand respect.

**A mon directeur de thèse, Monsieur le Docteur Franck Trimoreau,**

Malgré la distance et vos nombreuses autres préoccupations, vous avez toujours été là pour m'aider dans ce travail. Merci pour toutes les longues heures que vous m'avez consacrées, toujours très constructives, et pour votre disponibilité de chaque instant (surtout dans les derniers moments !) qui a été décisive. Vous m'avez transmis le virus de l'hématologie et en particulier de la cytologie lors des nombreuses heures passées au microscope à vos côtés. Vos qualités pédagogiques, votre gentillesse et votre calme ont fait de ces deux semestres un grand plaisir et un grand honneur de travailler avec vous. Je vous remercie pour tout ce que m'avez apporté. Merci aussi de m'avoir fait partager votre passion des vieilles anglaises l'année dernière ! A très bientôt dans une MG ou au bord d'un circuit je l'espère... !

**A Madame le Docteur Nathalie Gachard,**

Nathalie, je vous remercie pour toute l'aide que m'avez apportée, vos idées et surtout pour les manip de biologie moléculaire sans qui rien n'aurait été possible. Je sais que vous êtes également très occupée mais vos conseils ont toujours été très avisés et d'une grande aide pour moi. Je vous dois une très grande partie de ce travail et j'espère que vos travaux sur MYD88 continueront comme vous le souhaitez.

**A l'ensemble du personnel du laboratoire d'hématologie,**

Et en particulier aux techniciennes de biologie moléculaire, je vous remercie pour toutes les manip que vous avez effectuées et qui ont permis la réalisation de ce travail.

**Et bien sûr à mes parents,**

Je vous dois absolument tout. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi et pour tout ce que vous m'avez appris. Merci de m'avoir toujours motivé, poussé à faire de mon mieux et surtout pour votre soutien inconditionnel. Vous êtes des parents formidables. Et même si je suis loin de vous (en distance seulement !) depuis 4 ans, je ne vous oublie jamais. J'ai hâte de vous voir cet été entre Bayonne, les Issambres et Nancy ! Encore merci pour tout. Je vous aime.

**A toute ma famille,** qui m'a toujours soutenu,

Mes grands-parents Papi et Mamie, Thierry et Alexandra, François et Sylvie, Alain et Brigitte, Michèle, Philippe et Hélène, Monique et Gaby. A Laurence, tu nous manques beaucoup.

**A mes amis limougeaux et ex-limougeaux,**

Comme disait le poète, j'en ai vu des idiots-bêtes, mais des comme vous... chapeau ! Toinette mon co-galérien de thèse et Juyette, Guilbal le pompier et Auré sa Gest..., Docteur Tété (pari tenu ! et merci pour tes graphiques !) et Seb le montargois, l'apôtre Judas et Léo, Paki l'américain et Justine sa Gest..., Pascal le pisciniste et Annou la sauvageonne, Emilie et son pti'Olive, Soso, Dadou le contorsionniste, Tounu, Cloclo et le petit Paul, Julie, Anne-Laure, Popo, Alex, Raph et Rouckmouth, Caro et Jifi, Guigui, Max, et Sim-Sim.

Déjà 4 ans de fous rires et de tortures depuis cette fameuse (et fatigante !) première année à l'internat ! Merci pour les moments mémorables passés avec vous et ceux à venir ! J'attends la suite de nos aventures avec impatience !

**A tous les co-internes et internes que j'ai connus,** pour tous les bons moments (et parfois les galères !) passés ensemble dans les hôpitaux de Limoges, Bordeaux et Bayonne.

**A mes chefs de Bayonne : Anne-Christine, Fanny, Aguirre, Marie-Laure et David** qui m'ont laissé du temps de libre dans les derniers moments pour finir à l'heure. Vivement la suite du semestre !

**A tous ceux** qui n'ont pas pu faire le déplacement aujourd'hui et à tous ceux que j'ai oubliés !

## Sommaire

---

<b>Remerciements</b> .....	<b>4</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>7</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>12</b>
<b>Première partie : généralités</b> .....	<b>13</b>
I. Lymphopoïèse et immunopoïèse B normales .....	13
A. Organes lymphoïdes .....	13
B. Lymphopoïèse B .....	17
II. Lymphomes non Hodgkiniens B et lymphocytose B monoclonale .....	25
A. Lymphomes non Hodgkiniens B .....	25
B. Le lymphome lymphoplasmocytaire / la maladie de Waldenström .....	44
C. Lymphocytose B monoclonale (MBL) .....	50
III. Mutations de MYD88 et LNH B .....	62
A. Immunité innée et TLR .....	62
B. Implications de la mutation L265P de MYD88 dans les LNH B .....	66
IV. Principes généraux de biologie moléculaire : la PCR et le séquençage .....	71
A. Etape d'extraction de l'ADN .....	71
B. Principes de la PCR conventionnelle .....	72
C. Principes du séquençage selon la méthode de Sanger .....	75
<b>Deuxième partie : Etude rétrospective de la mutation L265P de MYD88 et du suivi de 26 cas de lymphocytose B monoclonale au CHU de Limoges entre 2005 et 2012</b> .....	<b>77</b>
I. Matériels et méthodes .....	77
A. Sélection des données et des patients .....	77
B. Etudes de biologie moléculaire .....	80
C. Traitement statistique des données .....	84
II. Résultats .....	85
A. Caractéristiques des MBL atypiques et non-LLC au diagnostic .....	85
B. Caractéristiques des MBL atypiques et non-LLC à la fin du suivi .....	89
C. Caractéristiques des MBL porteuses de la mutation L265P de MYD88 .....	92
D. Caractéristiques des MBL ayant une IgM monoclonale sérique ou non .....	100
III. Discussion .....	102
<b>Conclusion</b> .....	<b>107</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>108</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>116</b>

<b>Table des matières .....</b>	<b>125</b>
<b>Table des illustrations .....</b>	<b>128</b>
<b>Table des tableaux.....</b>	<b>130</b>



## Abréviations

---

ABC : Activated B-Cell like

AID : Activation-Induced cytidine Desaminase

ALPS : Syndrome Lymphoprolifératif avec Auto-immunité

APC : Allophycocyanine

APC-Cy7 : Allophycocyanine-Cyanine 7

$\beta$ 2m :  $\beta$ 2-microglobuline

BCR : B-Cell Receptor

BET : Bromure d'Ethidium

BOM : Biopsie Ostéo-Médullaire

CD : Cluster of Differentiation

CECOS : Centre d'Etude et de Conservation du Sperme

CMF : Cytométrie en Flux

CMV : Cytomégalovirus

CRP : Protéine C-Réactive

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

Cy5 : Cyanine 5

Cy5.5 : Cyanine 5.5

Cy7 : Cyanine 7

dATP : désoxyadénosine triphosphate

dCTP : désoxycytidine triphosphate

ddNTP : didésoxyribonucléotide triphosphate

dGTP : désoxyguanosine triphosphate

DLBCL : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules

dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate

dTTP : désoxythymidine triphosphate

EBV : Virus d'Epstein-Barr

ECD : Energy Coupled Dye

FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine

GCB : Germinal Center-B-cell like

HEV : Veinule à Haut Endothélium

HTLV : Human T-cell Leukemia Virus  
Ig : Immunoglobuline  
IGHV : région variable du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines  
IL-1R : Récepteur à l'Interleukine-1  
ILSG : International Lymphoma Study Group  
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif  
IWCLL : International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia  
KO : Krome Orange  
LDH : Lactate Deshydrogénase  
LH : Lymphome de Hodgkin  
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique  
LNH : Lymphome Non Hodgkinien  
LNH B : Lymphome Non Hodgkinien B  
LPL : Lymphome Lymphoplasmocytaire  
LRR : Région Riche en Leucine  
MAG : Myelin-Associated Glycoprotein  
MALT : Tissu Lymphoïde Associé aux Muqueuses  
MBL : Lymphocytose B Monoclonale  
MBR : Major Breakpoint clustering Region  
MGUS : Gammopathie Monoclonale de Signification Indéterminée  
MW : Maladie de Waldenström  
MYD88 : Myeloid Differentiation primary response gene 88  
MZL : Lymphome de la Zone Marginale  
NMZL : Lymphome de la Zone Marginale Ganglionnaire  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern  
pb : paire de base  
PB : Pacific Blue  
PC5 : Phycoérythrine-Cyanine 5  
PC5.5 : Phycoérythrine-Cyanine 5.5  
PC7 : Phycoérythrine-Cyanine 7  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PE : Phycoérythrine  
PMBL : Lymphome B Primitif du Médiastin

PNN : Polynucléaire Neutrophile  
REAL : Revised European American Lymphoma  
RSS : Séquence Signal de Recombinaison  
SDS : Dodécylsulfate de Sodium  
SLP B : Syndrome Lymphoprolifératif B  
SMZL : Lymphome de la Zone Marginale Splénique  
TCR : T-Cell Receptor  
TdT : Terminal désoxynucléotidyl Transférase  
TEP : Tomographie par Emission de Positons  
TLR : Toll-like Receptor  
Tm : Température de fusion  
VHC : Virus de l'Hépatite C  
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine  
ZAP-70 : Zêta Associated Protein-70

## Introduction

---

Initialement décrite comme une variante bénigne de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), la lymphocytose B monoclonale (MBL) est une entité relativement récente. Bien qu'elle ne soit pas encore officiellement reconnue par l'OMS, les critères diagnostiques sont définis depuis 2005 de manière consensuelle. Les patients atteints sont absolument asymptomatiques et présentent un clone lymphocytaire B inférieur à 5 G/L, accompagné ou non d'une hyperlymphocytose, et dont l'immunophénotypage est le plus souvent celui d'une LLC. Il existe de plus deux autres sous-groupes dans lesquels le profil immunophénotypique est aspécifique d'un lymphome non-Hodgkinien B (LNH B) : il s'agit des MBL dites « atypiques » et « non LLC ». Depuis, la très grande majorité des études ont porté sur les MBL LLC-like et celles-ci commencent à être de mieux en mieux connues sur le plan de leur prévalence, de leurs caractéristiques et de leur risque d'évolution, bien que rare, en LLC.

Parallèlement, les travaux sur l'immunité innée ont permis de mieux comprendre les mécanismes de son déclenchement et ses relations avec l'immunité adaptative. Ainsi, l'étude de la voie de signalisation des Toll-Like Receptor (TLR) a permis de mieux connaître le rôle de la protéine adaptatrice MYD88. Récemment, le séquençage du génome des patients atteints de LNH B a permis de mettre en évidence plusieurs mutations récurrentes, et notamment la mutation L265P de MYD88. Mais c'est surtout dans la maladie de Waldenström (MW) que celle-ci semble la plus fréquente, au point que sa détection pourrait faire partie des critères diagnostiques de la MW.

En revanche, les modes d'évolution et les mécanismes moléculaires et génétiques à l'origine des MBL atypiques et non-LLC sont très méconnus du fait du peu voire de l'absence d'études sur ces sous-types de MBL. L'objectif de ce travail était donc d'apporter quelques réponses à ces deux questions en étudiant le suivi à moyen terme et la fréquence de la mutation L265P de MYD88 sur 26 patients atteints de ces deux formes de MBL.

Après une première partie de généralités sur les caractéristiques clinico-biologiques des lymphocytoses B monoclonales, les mutations de MYD88 et les principales techniques de biologie moléculaire, nous aborderons ensuite l'étude elle-même et ses résultats.

## Première partie : généralités

---

### I. Lymphopoïèse et immunopoïèse B normales

La défense de l'organisme contre les agents étrangers et le développement de populations tumorales est dirigée d'une part par différents types cellulaires interagissant en permanence entre eux, et d'autre part par des mécanismes humoraux.

La survenue de mutations, de réarrangements ou de délétions de gènes contrôlant la prolifération des lymphocytes B et la synthèse d'anticorps se traduit par des affections clonales de cette lignée lymphocytaire : les lymphopathies malignes.

Ainsi, la connaissance des différents mécanismes de la différenciation lymphocytaire est une étape indispensable dans la compréhension de la lymphomagénèse.

#### A. Organes lymphoïdes

Durant la vie fœtale, l'organe assurant l'hématopoïèse est le foie. Puis, à partir de la naissance, la production des lymphocytes est assurée par la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Leur différenciation et leur maturation se feront :

- dans un premier temps dans les organes lymphoïdes primaires : moelle osseuse pour les lymphocytes B, thymus pour les lymphocytes T
- puis dans un second temps dans les organes lymphoïdes secondaires : ganglions, rate, tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT).

##### 1. Organes lymphoïdes primaires

Ils sont au nombre de deux : la moelle osseuse et le thymus. Le progéniteur lymphoïde peut quitter la moelle osseuse pour le thymus, aboutissant alors à la production des lymphocytes T, ou au contraire y rester et produire ainsi les lymphocytes B et NK.

Ce sont les lieux de maturation des lymphocytes. Les lymphocytes y acquièrent les marqueurs de surface spécifiques de leur lignée (par exemple le CD19 pour les lymphocytes B et le CD3 pour les lymphocytes T) ainsi qu'un récepteur différent pour chacune des cellules : le BCR (B-Cell Receptor) pour les lymphocytes B, et le TCR (T-Cell Receptor) pour les lymphocytes T. Les premières étapes de formation du BCR et du TCR se produisent en l'absence d'antigène suite à de nombreux mécanismes de recombinaisons dans les gènes des chaînes lourdes et légères. Ainsi, la quantité de BCR et TCR différents produits est considérable, ce qui implique une sélection ultérieure après la rencontre avec l'antigène.

Au sein des organes lymphoïdes primaires, les lymphocytes B et T naïfs subissent donc une étape de maturation initiale qui sera poursuivie dans les organes lymphoïdes secondaires, lieux de rencontre avec l'antigène.

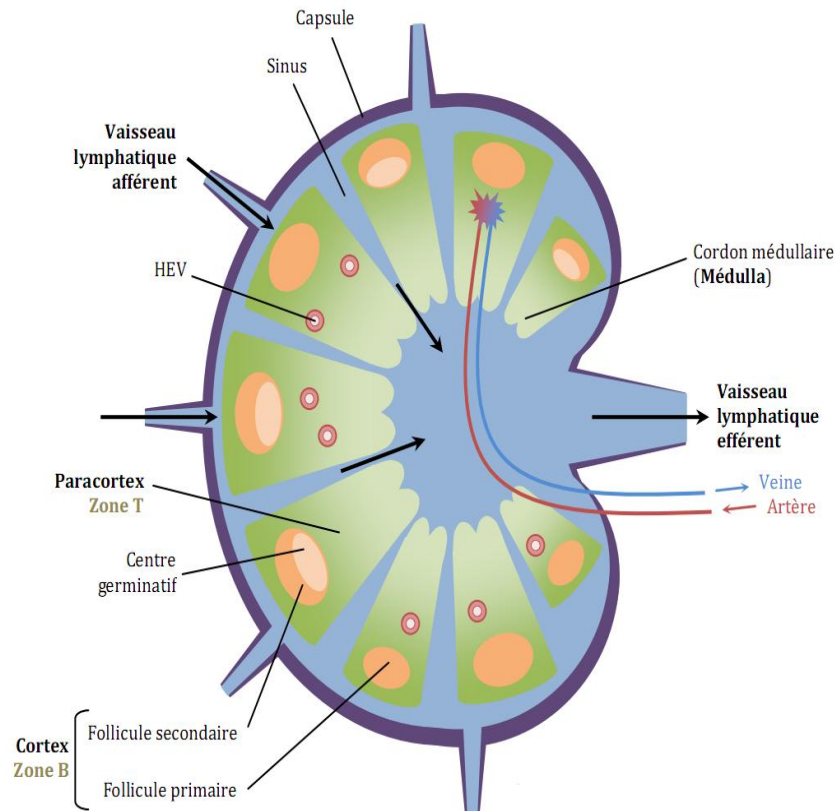
## 2. Organes lymphoïdes secondaires

La connaissance de l'architecture normale des organes lymphoïdes secondaires est indispensable car elle est à la base de la classification actuelle des LNH.

Ces organes lymphoïdes secondaires se développent dès la naissance suite aux contacts avec les antigènes de l'environnement. Ils sont de deux types : systémiques (représentés par les ganglions lymphatiques ou nœuds lymphatiques et par la pulpe blanche de la rate), et muqueux (MALT).

### a. Les ganglions lymphatiques

Ils sont présents dans tout l'organisme et sont reliés entre eux par les vaisseaux lymphatiques, formant ainsi des chaînes ganglionnaires. La lymphe, issue du liquide interstitiel, permet la circulation des antigènes jusqu'aux ganglions pour la rencontre avec les lymphocytes. Les ganglions sont entourés d'une capsule conjonctive fibreuse par laquelle passe le système lymphatique afférent très développé (figure 1). La lymphe circule ensuite par des sinus et est expulsée dans le réseau lymphatique par un seul vaisseau lymphatique efférent.



**Figure 1 : Schéma d'un ganglion lymphatique [1]**

Au sein d'un ganglion, on distingue trois parties [2] :

- Le cortex, zone la plus externe du ganglion, contenant :
  - les follicules lymphoïdes primaires, amas de lymphocytes B naïfs quiescents,
  - les follicules lymphoïdes secondaires. En périphérie de ces follicules, la « zone marginale » est peu présente dans les ganglions lymphatiques mais bien développée dans le tissu lymphoïde associé aux muqueuses. Ces follicules secondaires comprennent :
    - Une couronne périphérique appelée « la zone du manteau »
    - Le « centre germinatif » ou « centre clair » où ont lieu les phénomènes de prolifération et de différenciation des lymphocytes B en cellules immunocompétentes. Le centre germinatif présente lui-même deux zones :
      - une zone sombre, riche en centroblastes, représentant la zone d'expansion clonale. En présence de cellules folliculaires dendritiques et de lymphocytes T a lieu la rencontre entre l'antigène et la cellule B portant l'immunoglobuline de surface

spécifique de cet antigène. Comme en témoignent les nombreuses images de mitoses, la prolifération de la cellule B est intense. Tous les centroblastes produits possèdent une affinité différente pour l'antigène suite aux mutations somatiques intervenues sur les gènes des immunoglobulines.

- une zone claire, constituée majoritairement de centrocytes et de quelques immunoblastes. Une première étape de sélection intervient, caractérisée par l'importance de l'apoptose lymphocytaire. En effet, toutes les cellules B dont l'affinité pour l'antigène est faible sont éliminées suite au processus de sélection des lymphocytes en fonction de leur affinité pour l'antigène, d'où la présence de nombreux macrophages à corps tingibles. Puis, dans l'étape de différenciation, les cellules B sélectionnées évoluent en centrocytes, en immunoblastes et en cellules B mémoires. Les immunoblastes évolueront en plasmocytes qui migreront vers la medulla et les cellules B mémoires vers la zone marginale. [2]

- Le paracortex, zone intermédiaire dépourvue de follicules mais riche en lymphocytes T et en cellules dendritiques, et contenant des veinules à haut endothélium (HEV) permettant l'entrée des lymphocytes sanguins dans le ganglion.
- La medulla, zone la plus interne, composée essentiellement de sinus, macrophages, lymphocytes B mémoires et plasmocytes.

Au sein de ces organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes se localisent de façon préférentielle dans certaines structures : par exemple, les lymphocytes B occupent surtout les centres germinatifs tandis que les lymphocytes T surtout la zone paracorticale. De plus, il existe un phénomène de recirculation continue des lymphocytes naïfs entre les différents territoires qu'ils occupent dans ces organes. Ces deux mécanismes permettent d'augmenter considérablement les chances qu'un lymphocyte rencontre l'antigène contre lequel il est dirigé.

Au final, les ganglions lymphatiques présentent des fonctions essentielles dans l'immunité : concentration et filtration des antigènes, déclenchement de la réponse immunitaire et recirculation des lymphocytes.



### b. La pulpe blanche de la rate

La rate est uniquement en relation avec la circulation sanguine. Comme le foie, elle participe à l'hématopoïèse durant la vie fœtale. Après la naissance, la quasi-totalité de son volume (99%) est dévolue à la dégradation des hématies au sein de la pulpe rouge. Seul 1% de son volume, la pulpe blanche, est consacré à la lymphopoïèse.

Cette pulpe blanche est essentiellement constituée de lymphocytes et se concentre autour d'artérioles appelées « gaines lymphatiques » ou PALS (PeriArterial Lymphoid Sheath). Au centre, il s'agit surtout de lymphocytes T et en périphérie de lymphocytes B associés à une zone marginale. [2]

Organe très vascularisé, la rate assure ainsi un rôle de filtre du sang et de surveillance des antigènes.

### c. Tissu lymphoïde associé aux muqueuses

Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses ou MALT représente 80% de la masse totale du tissu lymphoïde de l'organisme et contribue à la protection des 400 m<sup>2</sup> de muqueuses de l'organisme. Spécialisé dans la synthèse d'IgA, il est notamment présent au niveau ORL (anneau de Waldeyer), digestif (plaques de Peyer, follicules lymphoïdes de la paroi de l'intestin grêle formant le GALT ou tissu lymphoïde associé aux intestins), pulmonaire (tissu lymphoïde associé aux bronches ou BALT).

## B. Lymphopoïèse B

L'ontogénèse des lymphocytes B peut se diviser en deux phases principales en fonction de la dépendance ou non à l'antigène.

La première phase consiste en une différenciation et une maturation du lymphocyte B sans qu'il n'ait jamais rencontré d'antigène. Cette étape est localisée dans la moelle osseuse et permet de passer d'une cellule souche hématopoïétique à un lymphocyte B naïf porteur d'une immunoglobuline de surface capable de reconnaître l'antigène.

La seconde phase se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires et dépend des antigènes du soi puis du non-soi. Il y a activation et différenciation terminale des lymphocytes B en plasmocytes et lymphocytes B mémoires.

## 1. Différenciation et maturation intra-médullaires des lymphocytes B

### a. Le BCR, récepteur des lymphocytes B pour l'antigène

#### i. Structure du BCR

La reconnaissance spécifique de l'antigène est le mécanisme essentiel de l'immunité adaptative. Pour le lymphocyte B, c'est le BCR (B-cell Receptor) qui sert de récepteur spécifique pour l'antigène. Il est composé d'une immunoglobuline de surface synthétisée par la cellule elle-même et des chaînes  $Ig\alpha$  (ou CD79a) et  $Ig\beta$  (ou CD79b) porteuses de motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). Celles-ci sont impliquées dans la transduction du signal.

Cette immunoglobuline est composée de deux chaînes lourdes H (Heavy) identiques et de deux chaînes légères L (Light) identiques également. Elles sont associées entre elles par des ponts disulfures. Il existe cinq types de chaînes lourdes : gamma, mu, alpha, delta et epsilon, tandis qu'il n'y a que deux types de chaînes légères : kappa et lambda. Chacune de ces quatre chaînes se compose d'une partie constante C et d'une partie variable V spécifique d'un antigène donné. Le site de reconnaissance de l'antigène est représenté par l'association des domaines variables des chaînes lourdes et des chaînes légères (figure 2).

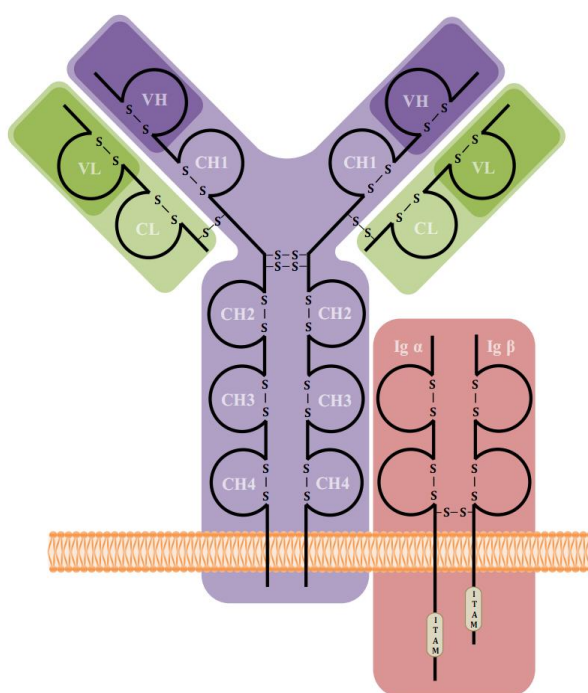


Figure 2 : Structure du BCR [1]

Les chaînes lourdes et légères sont codées par plusieurs gènes organisés en loci et situés sur des chromosomes différents.

Pour les chaînes lourdes, le locus (dit IGH) est situé sur le chromosome 14. Les régions variables V sont codées par trois familles de gènes : les gènes V (pour « variabilité », dont 38 à 46 sont fonctionnels), les gènes D (pour « diversité », dont 23 sont fonctionnels) et les gènes J (pour « jonction », dont six sont fonctionnels). [3] Pour les régions constantes C, neuf gènes codent les neuf classes et sous-classes d'immunoglobulines possibles.

Dans le cas des chaînes légères, deux chromosomes sont impliqués : le chromosome 2 pour les chaînes légères  $\kappa$  et le chromosome 22 pour les chaînes légères  $\lambda$ . Il n'existe pas de gènes D (figure 3). [4]

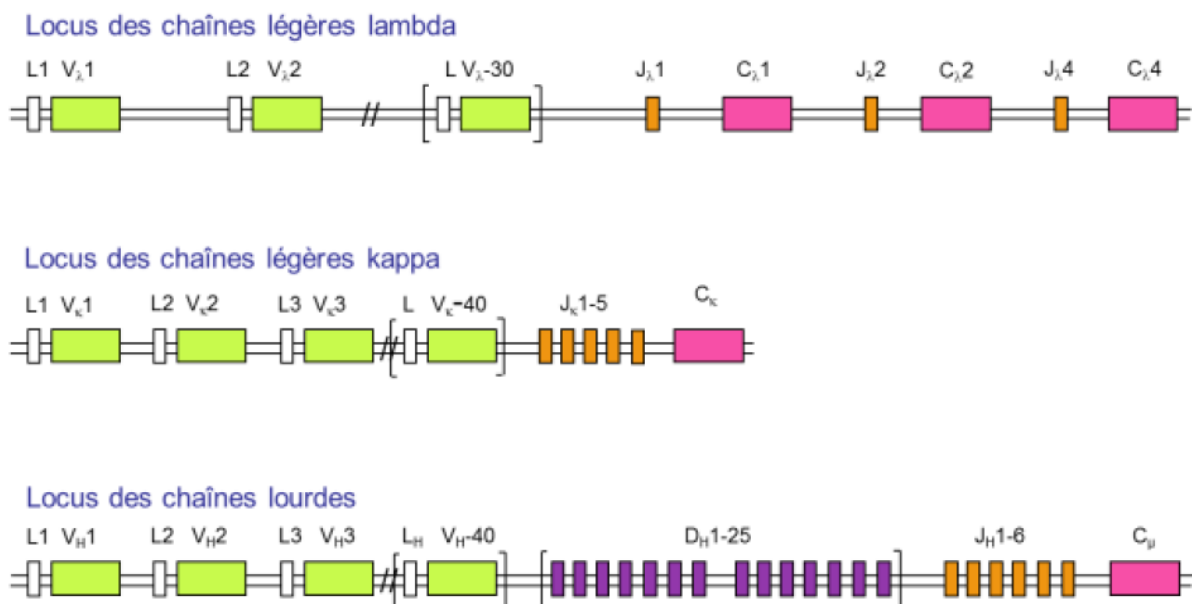


Figure 3 : Organisation des gènes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines [4]

## ii. Mécanismes de création de la diversité des immunoglobulines

Durant la vie de l'organisme, le nombre d'antigènes différents rencontrés étant considérable et les régions constantes des chaînes lourdes et légères par définition invariables, la reconnaissance des antigènes par le BCR est permise grâce à la diversité des gènes des régions variables des immunoglobulines. Ceci est possible grâce à deux mécanismes : la diversité combinatoire et la diversité jonctionnelle.

La diversité combinatoire consiste en un réarrangement purement aléatoire des gènes codant les régions variables des chaînes lourdes et légères. Cette recombinaison, appelée « recombinaison V(D)J » a tout d'abord lieu sur les gènes des chaînes lourdes.

Dans un premier temps, un gène D de chaîne lourde (DH) s'associe avec un gène J (JH). Cette étape n'est possible que si les séquences d'ADN situées de part et d'autre de ces gènes V, D et J ont été reconnues par des enzymes, les recombinases Rag-1 et Rag-2. Ces séquences sont dénommées « séquences RSS » (Séquences Signal de Recombinaison). Elles sont constituées d'un nonamère et d'un heptamère séparés par 12 ou 23 paires de bases (pb). Ces espaceurs correspondent respectivement à un et deux tours d'hélice de l'ADN. Les recombinases vont pour pouvoir se lier à ces espaceurs, rapprocher les gènes V et D en formant une épingle à cheveux et ainsi permettre la ligation des deux gènes. La recombinaison ne peut avoir lieu qu'entre un gène portant une RSS contenant un espaceur de 12 pb et une RSS contenant un espaceur de 23 pb. Cette règle 12/23 garantit ainsi qu'il n'y ait pas de recombinaisons entre les gènes V et J des chaînes lourdes (figure 4).

Dans un second temps, un gène de variabilité V de chaîne lourde (VH) se réarrange avec cette association D-JH selon le même mécanisme : on obtient alors un exon VDJ [4].

La recombinaison des gènes des chaînes légères se déroule ensuite mais, n'ayant pas de gènes D, il n'y a qu'un réarrangement entre les gènes VL et JL afin de former un exon VJ.

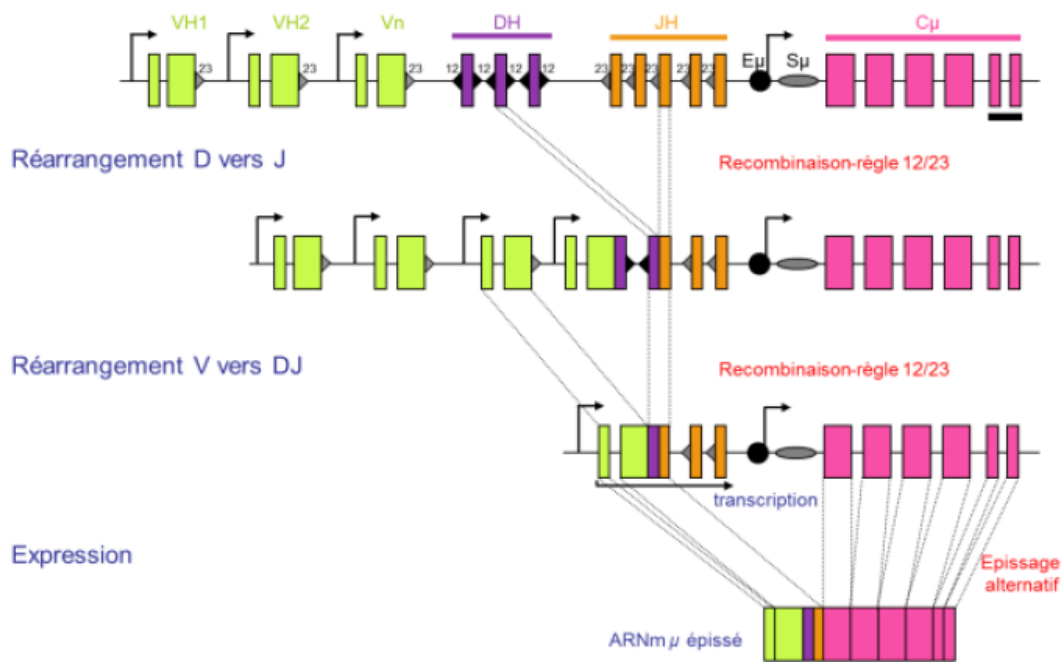
Dans les deux cas, l'ADN présent entre les deux gènes qui se réarrangent est excisé sous forme d'épisome (ADN circulaire).

Les exons VDJ et VJ ainsi créés s'associent ensuite aux exons codant les régions constantes.

Enfin, après une étape d'épissage alternatif, l'ARN produit peut être traduit en protéines, c'est-à-dire en immunoglobulines, dans le cytoplasme. L'association aux chaînes légères se fera dans le réticulum endoplasmique.

Il est important de noter que cette recombinaison V(D)J est soumise à deux niveaux de contrôles :

- les recombinases ne sont exprimées qu'à certains stades de différenciation des lymphocytes B,
- les séquences RSS peuvent être masquées et ainsi empêcher toute recombinaison.



**Figure 4 : Recombinaison VDJ des gènes des chaînes lourdes [4]**

La diversité jonctionnelle est le second moyen pour augmenter la diversité des immunoglobulines face aux antigènes. En effet, à chaque recombinaison, des mécanismes de réparation de l'ADN entrent en jeu et, sous l'action de plusieurs enzymes, la zone de jonction entre les gènes peut varier de quelques nucléotides. Ceci est particulièrement le cas avec la terminal désoxynucléotidyl transférase (TdT), une enzyme qui peut ajouter jusqu'à quinze nucléotides de façon aléatoire [4].

### iii. Exclusion allélique et exclusion isotypique

Les gènes des chaînes lourdes sont réarrangés en premier face aux gènes des chaînes légères. Si le réarrangement est improductif sur le premier chromosome porteur de ces gènes, alors la cellule tente un réarrangement sur le chromosome du second parent. Si un nouvel échec se produit, la cellule entre en apoptose. Ainsi une immunoglobuline n'est produite qu'à partir d'un seul chromosome 14 et d'un seul chromosome 2 ou 22 : c'est le phénomène d'exclusion allélique.

Puis, le réarrangement des gènes des chaînes légères n'intervient que si celui des chaînes lourdes a réussi. Une première tentative a toujours lieu avec la chaîne kappa, et de la même manière, d'abord sur le chromosome d'un des deux parents, puis en cas d'échec sur le second, et enfin sur les gènes de la chaîne lambda. L'immunoglobuline n'exprimera donc

qu'un seul type de chaîne légère, soit kappa soit lambda mais jamais les deux à la fois : c'est l'exclusion isotypique [4].

## b. Ontogénèse intra-médullaire des lymphocytes B

### i. Stade pré-pro B

Ce sont les précurseurs B les plus immatures dans la moelle osseuse et, n'exprimant que faiblement les gènes RAG-1 et RAG-2, le réarrangement des gènes des immunoglobulines n'a pas encore eu lieu.

### ii. Stade pro-B

C'est le début du réarrangement des gènes des immunoglobulines, au niveau des chaînes lourdes tout d'abord avec la jonction d'un segment DH à un segment JH puis d'un segment VH avec le segment DJH réarrangé. In fine, cela aboutit à la synthèse d'une chaîne lourde  $\mu$  intracytoplasmique. C'est également à ce stade qu'apparaît le CD19, marqueur spécifique des lymphocytes B. [4]

### iii. Stade pré-B

La chaîne lourde  $\mu$  formée est ensuite exprimée en petite partie à la surface formant un pré-BCR. C'est à ce moment que le réarrangement des gènes des chaînes lourdes s'arrête (phénomène d'exclusion allélique) tandis que le réarrangement des gènes des chaînes légères commence. [4]

### iv. Stade B immature

La chaîne légère est synthétisée et peut désormais s'associer à la chaîne  $\mu$  du pré-BCR formant ainsi une IgM de surface capable de reconnaître l'antigène.

Puis, par un mécanisme de sélection négative, les lymphocytes B naïfs portant des immunoglobulines dirigées contre les antigènes du soi sont éliminés tandis que les autres survivent et passent de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes secondaires. [4]

## 2. Etapes post-médullaires dépendantes de l'antigène

### a. Différenciation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires

Après avoir quitté la moelle osseuse, les cellules B immatures gagnent les organes lymphoïdes secondaires et parviennent au stade B transitionnel. Ces cellules B transitionnelles rejoignent tout d'abord la rate afin de recevoir un signal par leur BCR. Deux destinées sont alors possibles. Plusieurs études sur la souris ont montré l'importance de la voie Notch2 dans l'engagement vers l'une ou l'autre des ces deux voies [5] :

- en présence d'un signal Notch2, il y a différenciation en lymphocytes B de la zone marginale, contribuant ainsi à la réponse T-indépendante.
- en l'absence de signal Notch2, la différenciation se fait en lymphocytes B folliculaires, contribuant ainsi à la réponse T-dépendante. Ces cellules deviennent « recirculantes » ou « naïves ». Après rencontre avec l'antigène et avec la coopération des cellules folliculaires dendritiques, elles peuvent se différencier en plasmocytes à IgM ou former les centres germinatifs afin de procéder aux processus d'hypermutation somatique et de commutation isotypique et enfin en cellules B mémoires.

### b. Modifications du BCR après contact avec l'antigène

Après contact avec l'antigène, plusieurs modifications surviennent dans la structure du BCR :

- Il y a disparition des immunoglobulines membranaires au profit d'une sécrétion d'IgM. Ceci est dû à une modification de la maturation des ARN messagers des chaînes lourdes aboutissant à la traduction en immunoglobulines ne possédant pas de domaine d'ancrage à la membrane cytoplasmique.
- Dans la zone sombre des centres germinatifs, le centroblaste va subir des mutations portant sur les régions variables des gènes des immunoglobulines et permettant d'augmenter l'affinité pour l'antigène. Ces mutations sont le fruit de l'activité d'une enzyme, l'AID (Activation-Induced cytidine Desaminase) et aboutissent à la formation de centrocytes. C'est le phénomène d'hypermutations somatiques [4].

- Enfin, après sélection des immunoglobulines possédant une affinité augmentée à l'antigène au niveau du stade de centrocyte, survient le mécanisme de « commutation de classe » ou « commutation isotypique » dans lequel des immunoglobulines d'un autre isotype (IgG, IgA ou IgE) sont synthétisées en remplacement des IgM. Elles composeront la réponse secondaire. Cette commutation de classe est permise par le déplacement d'un segment VDJ réarrangé vers un segment constant d'une autre classe d'immunoglobuline. Il n'y a pas de modifications de la spécificité antigénique (figure 5). [4]

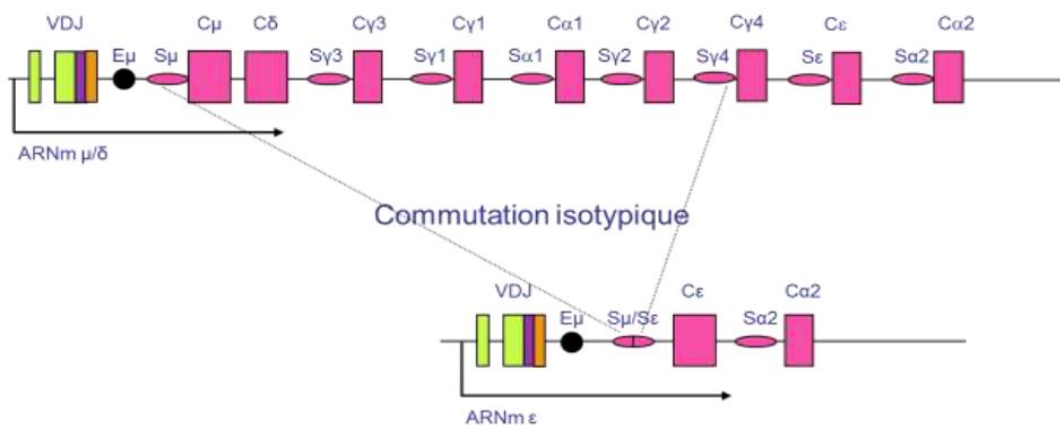


Figure 5 : Mécanisme de commutation isotypique : exemple de la synthèse d'IgE [4]

Une fois ces étapes terminées, le centrocyte achève sa maturation en devenant un lymphocyte B mémoire dans la zone marginale ou un plasmocyte. La figure 6 résume l'ensemble de ces étapes.

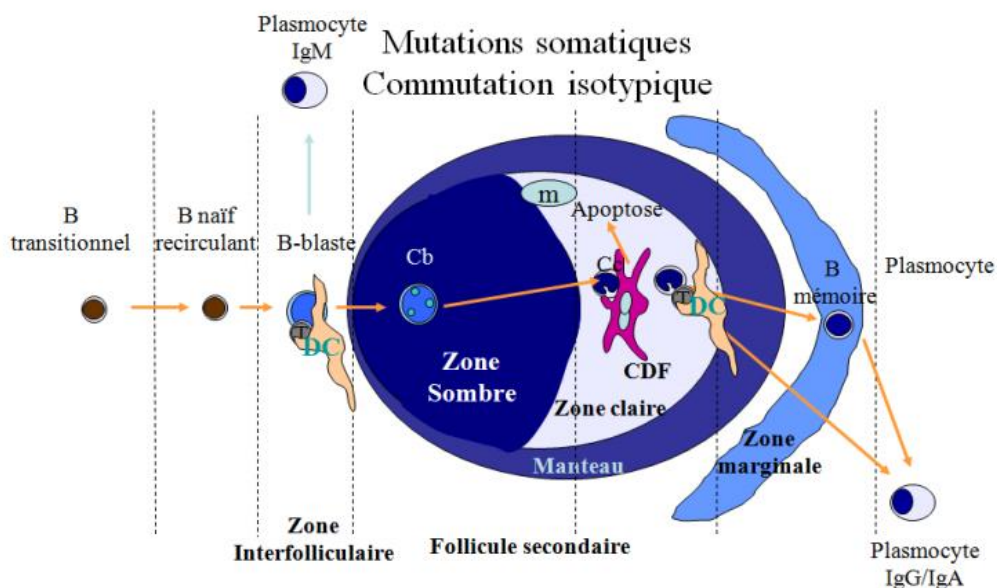


Figure 6 : Etapes de la maturation des lymphocytes dans le ganglion



## II. Lymphomes non Hodgkiniens B et lymphocytose B monoclonale

### A. Lymphomes non Hodgkiniens B

Les lymphomes sont des affections malignes primitives du tissu lymphoïde. Ils sont divisés en deux groupes : le lymphome de Hodgkin (LH), anciennement appelé maladie de Hodgkin, et par opposition, les lymphomes non-Hodgkiniens (LNH), anciennement dénommés lymphomes malins non-Hodgkiniens.

Les LNH se développent principalement dans les ganglions mais, dans 40 % des cas environ, on note une atteinte extra-ganglionnaire, qu'elle soit isolée ou associée [6]. Les localisations spléniques, digestives, ORL, testiculaires, cutanées et cérébrales sont les plus fréquentes.

De plus, les LNH constituent un groupe hétérogène par :

- La lignée lymphoïde à l'origine de la prolifération maligne : B, T ou NK
- Le degré de différenciation des cellules malignes
- L'histologie des ganglions atteints
- L'épidémiologie
- La présentation clinique : indolente ou agressive d'emblée
- Le pronostic
- Le traitement

#### 1. Classification des LNH B

La première classification des LNH a été élaborée par H. Rappaport en 1966 et différenciait les lymphomes en fonction de la taille (petite ou grande) des cellules et de l'architecture du ganglion (nodulaire ou diffuse). C'était donc une classification purement morphologique.

Puis, avec l'avènement de l'immunologie, furent proposées de part et d'autre de l'océan Atlantique deux classifications : l'une, celle de R. Lukes et R. Collins [7] aux Etats-Unis, était principalement basée sur les travaux anatomopathologiques de Rappaport, l'autre,

celle de Kiel en Europe proposée par Karl Lennert [8], associait aux données morphologiques des données immunologiques et distinguait les lymphomes B des lymphomes T.

En 1994, sous l'impulsion d'anatomopathologistes européens et nord-américains regroupés dans l'International Lymphoma Study Group (ILSG), est apparue la classification REAL (Revised European American Lymphoma) mettant en commun les données histologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et cliniques et dont le but était de définir des entités clinico-biologiques reproductibles entre les différents centres.

Enfin, en 2001, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) publie la première classification internationale. Elle sera révisée sept ans plus tard en 2008 (figure 7). [9]

**Lymphomes B**

- Tumeurs des précurseurs lymphoïdes B**
  - Leucémie / lymphome lymphoblastique B
- Tumeurs des cellules B matures**
  - Leucémie lymphoïde chronique / lymphome lymphocytaire
  - Leucémie prolymphocytaire B
  - Lymphome splénique de la zone marginale
  - Lymphomes / leucémies spléniques inclassables (lymphome splénique diffus de la pulpe rouge à petits lymphocytes)\*
  - Leucémie à tricholeucocytes
  - Lymphome lymphoplasmocytaire (et maladie de Waldenström)
  - Néoplasies plasmocytaires
  - Maladie des chaînes lourdes ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ )
  - Lymphome extraganglionnaire de la zone marginale des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT)
  - Lymphome ganglionnaire de la zone marginale
  - Lymphome folliculaire
  - Lymphome centrofolliculaire primitivement cutané
  - Lymphome du manteau
  - Lymphome B diffus à grandes cellules sans autre spécification (variantes : centroblastique, immunoblastique, anaplasique)
  - Lymphome à grandes cellules B riche en cellules T / histiocytes
  - Lymphome à grandes cellules B médiastinal (thymique)
  - Lymphome à grandes cellules primitivement cutané (type des membres)
  - Lymphome à grandes cellules B du système nerveux central
  - Lymphome à grandes cellules B intravasculaire
  - Lymphome à grandes cellules associé à une inflammation chronique
  - Granulomatose lymphomatoïde
  - Lymphome à grandes cellules B EBV+ du sujet âgé\*
  - Lymphome à grandes cellules B ALK+
  - Lymphome plasmablastique
  - Lymphome primitif des séreuses
  - Lymphome à grandes cellules B HHV8+ associé à la maladie de Castleman multicentrique
  - Lymphome de Burkitt
  - Lymphome B inclassable avec caractéristiques intermédiaires entre lymphome B diffus à grandes cellules et lymphome de Burkitt\*
  - Lymphome B inclassable avec caractéristiques intermédiaires entre lymphome B diffus à grandes cellules et lymphome de Hodgkin classique\*

\* entités provisoires

**Figure 7 : Classification OMS 2008 des LNH B [9]**

## 2. Epidémiologie des LNH

Pour l'année 2011, l'institut national du cancer a dénombré en France 3670 décès par LNH : 1990 hommes (soit 2.4% de l'ensemble des cancers, 8<sup>e</sup> rang en terme de mortalité) et 1680 femmes (2.7% des cancers, soit le 6<sup>e</sup> rang). [10]

Cette prédominance masculine (54%) se retrouve également en termes d'incidence : en 2011 toujours, 11 700 nouveaux cas de LNH ont été recensés dont 6400 chez les hommes et 5300 chez les femmes. Chez l'homme, cela représente 3.1% des nouveaux cancers diagnostiqués, ce qui place les LNH au 7<sup>e</sup> rang tous cancers confondus. Chez la femme, ils contribuent à 3.3% des cancers soit le 5<sup>e</sup> rang.

La répartition des LNH dans le monde montre également de grandes inégalités géographiques : alors que les LNH B sont majoritaires (85%) dans les pays occidentaux, les LNH T sont les plus fréquents en Asie. [9]

Dans une étude nord-américaine, lorsque l'origine ethnique était prise en compte, l'incidence était plus élevée dans la population blanche que dans la population noire [11].

Ces variations d'incidence dans le monde se retrouvent également au sein des régions françaises : l'Île de France, les Pays de la Loire et le Poitou-Charentes ont la plus forte incidence contrairement au Limousin et aux régions du nord de la France (figure 8). [10]

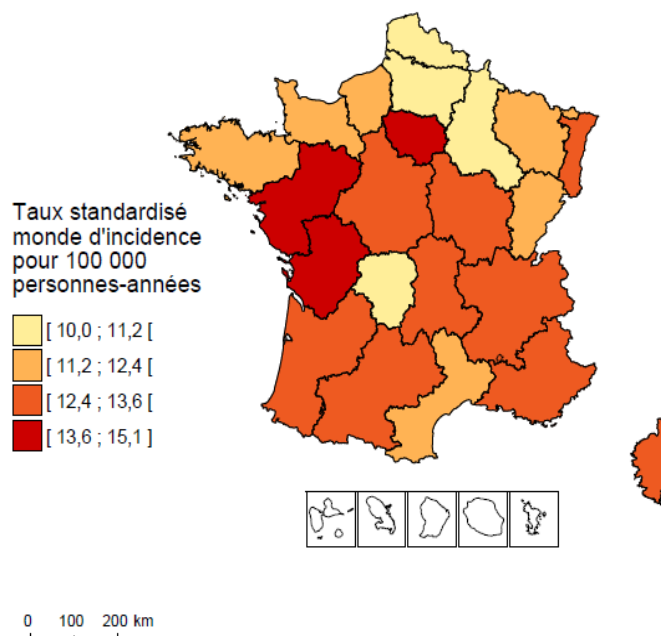


Figure 8 : Taux d'incidence des LNH B entre 2008 et 2010 et par région [10]

Après plusieurs décennies de constante augmentation, l'incidence semble se stabiliser depuis 2005 (figure 9). [12]

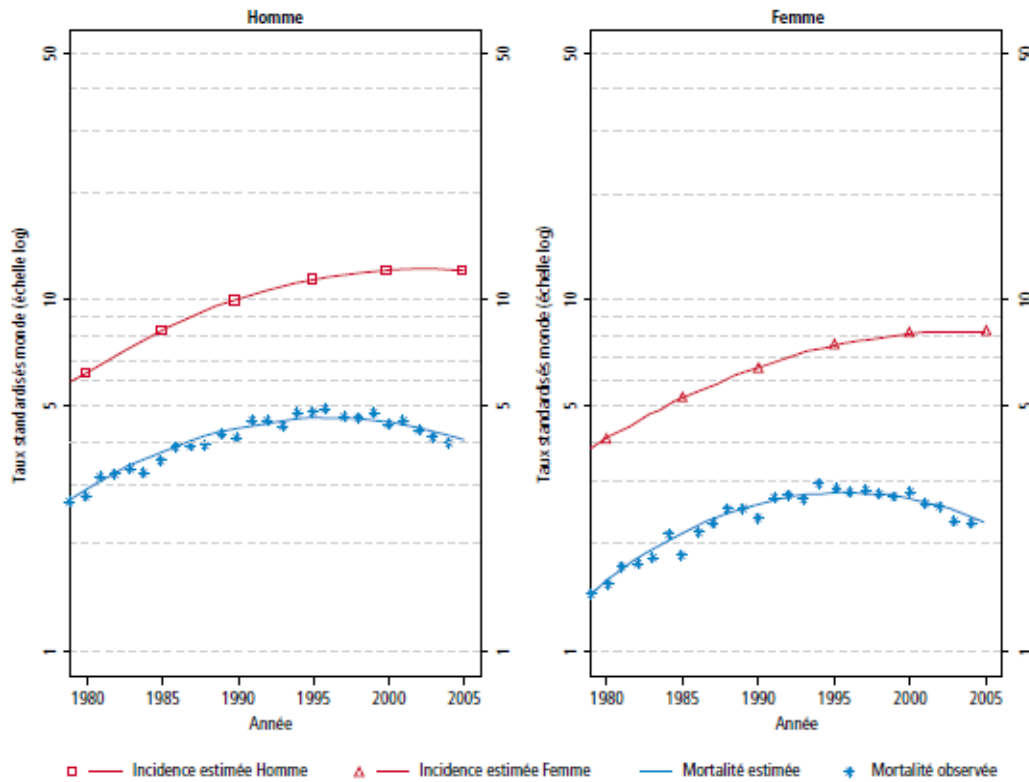


Figure 9 : Evolution de l'incidence et de la mortalité des LNH B entre 1980 et 2005 [12]

Les LNH peuvent survenir à tout âge, adolescence et enfance comprises. Néanmoins, on note une augmentation de l'incidence à partir de 65 ans (figure 10). [12] L'âge médian au diagnostic est de 64 ans chez l'homme et de 70 ans chez la femme [6].

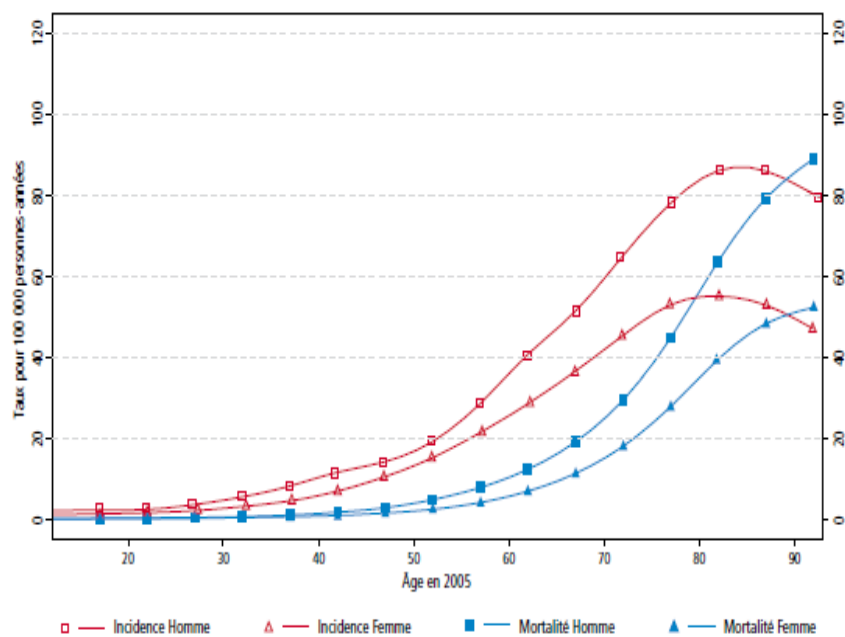
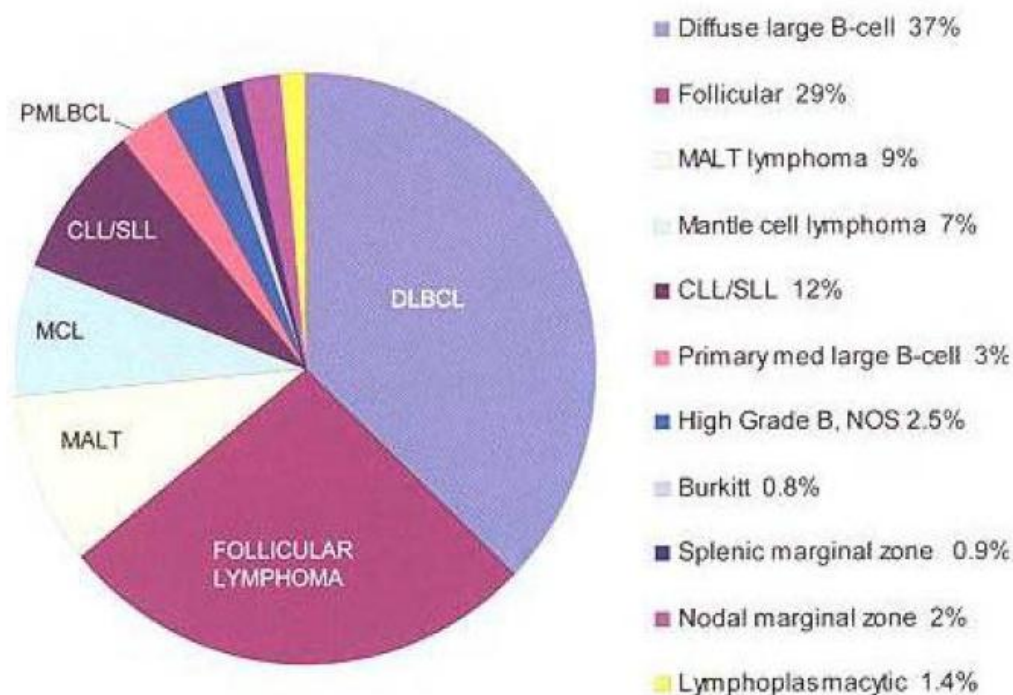


Figure 10 : Evolution de l'incidence et de la mortalité des LNH B en fonction de l'âge [12]

Au sein des LNH B, deux entités dominent : le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) et le lymphome folliculaire. A elles deux, elles représentent deux tiers des LNH B (figure 11). [9]

De plus, on distingue au sein des LNH B deux formes très distinctes par leur présentation clinique, leur traitement et leur histoire naturelle :

- Les LNH « agressifs » ou « de haut grade de malignité », qui représentent 50 à 60% des LNH [6] et qui surviennent en quelques semaines, accompagnés de signes cliniques importants. Le traitement doit alors être mis en place très rapidement, l'évolution étant systématiquement péjorative en son absence. Le lymphome B diffus à grandes cellules représente un prototype de LNH agressif.
- les LNH « indolents » ou « de bas grade de malignité », qui représentent 40 à 50% des LNH [6] et dont l'évolution est très lente, le plus souvent sur plusieurs mois à plusieurs années et les signes cliniques peu nombreux. Après traitement, les rechutes sont néanmoins fréquentes et une transformation en LNH agressif peut survenir. Le principal représentant est le lymphome folliculaire.



**Figure 11 : Fréquences relatives des différentes formes de LNH B. (DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules, MALT : tissu lymphoïde associé aux muqueuses, MCL : lymphome du manteau, CLL/SLL : leucémie lymphoïde chronique/lymphome lymphocytaire, PMLBCL : lymphome B à grandes cellules primitif du médiastin, NOS : sans autre spécification) [9]**

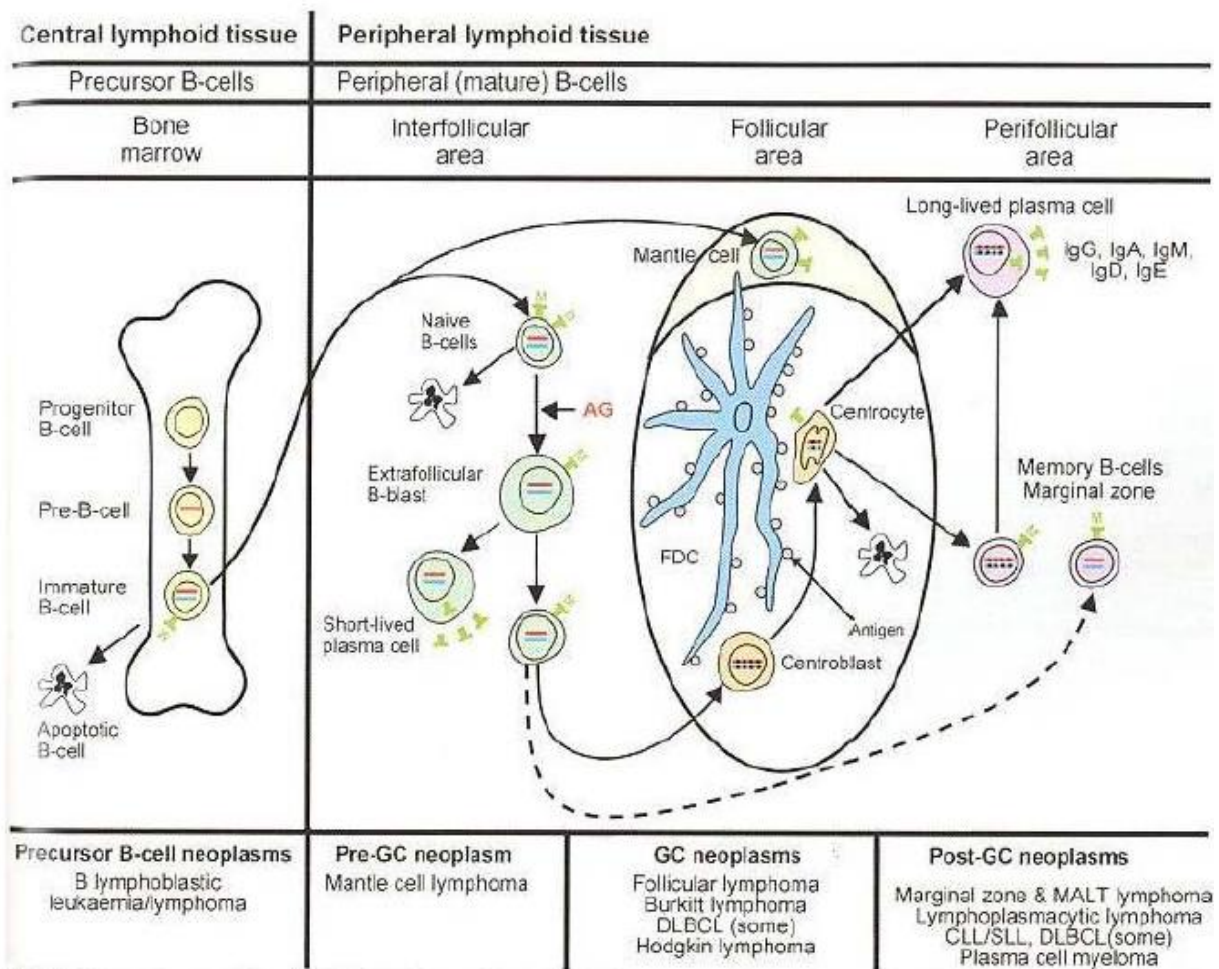
### 3. Facteurs de risque

Dans la majorité des cas, la survenue d'un lymphome semble multifactorielle et les étiologies sont difficiles à identifier. Néanmoins, les principaux facteurs de risque reconnus à ce jour sont :

- Les agents infectieux [14] :
  - Virus : Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et Lymphome B diffus à grandes cellules et lymphome de Burkitt, virus de l'hépatite C (VHC) et lymphome lymphoplasmocytaire et lymphome de la zone marginale, virus d'Epstein-Barr (EBV) et lymphome de Burkitt...
  - Bactérie : *Helicobacter pylori* et lymphome du MALT, l'éradication de cette bactérie par un traitement antibiotique associé à un inhibiteur de la pompe à proton guérit le lymphome dans environ 50% des cas.
- L'immunodépression chronique : médicaments immunosuppresseurs dans les greffes d'organes en particulier
- agents environnementaux : solvants dérivés du benzène [15], pesticides agricoles (diazinon, atrazine), dioxines
- affections génétiques constitutionnelles : ataxie-télangiectasie, syndrome de Wiskott-Aldrich, syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité (ALPS)... [16]
- Les antécédents de chimiothérapie, notamment l'utilisation d'agents alkylants.

### 4. Physiopathologie

La très grande diversité des LNH aussi bien dans la nature et le stade des cellules impliquées que dans la présentation clinique est la conséquence directe de l'hétérogénéité des mécanismes physiopathologiques. La dernière classification de l'OMS définit chaque sous-type de LNH en fonction de l'existence de sa contrepartie physiologique. De ce point de vue, chaque LNH est donc issu d'une étape de la différenciation lymphoïde B (figure 12).



**Figure 12 : Relations entre les différents stades de la différenciation lymphocytaire B et les principaux lymphomes non hodgkiniens [9]**

Il est aujourd'hui établi que la plupart des LNH sont dus à des anomalies génétiques récurrentes sur les gènes codant la prolifération et la différenciation cellulaire, en particulier les translocations. Les deux principaux mécanismes fondateurs reconnus sont :

- la fusion de deux gènes, conduisant à une protéine nouvelle aux propriétés oncogéniques
- la juxtaposition d'un oncogène (notamment Bcl2, Bcl6, C-myc...) avec les éléments régulateurs d'autres gènes, comme les promoteurs par exemple.

De plus, il est établi que la transformation tumorale nécessite également l'accumulation de mutations secondaires amenant à des dérégulations des fonctions de survie, d'apoptose, de prolifération, de maturation... : ce modèle d'oncogénèse est dit de « multi-hit ».

La détection de ces réarrangements par biologie moléculaire et cytogénétique est fondamentale dans le diagnostic et le pronostic des LNH.

#### a. Exemple d'un LNH indolent : le lymphome folliculaire

Dans le lymphome folliculaire, la translocation t(14 ;18) est retrouvée dans environ 85% des cas. Elle aboutit à un échange de matériel génétique entre :

- les gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines situés sur le chromosome 14. Les points de cassure sont situés au niveau des gènes de jonction des chaînes lourdes des immunoglobulines (JH).

- et le gène Bcl2, un oncogène majeur anti-apoptotique situé sur le chromosome 18. Il existe dans ce cas plusieurs points de cassure, la cassure dans la région MBR (Major Breakpoint clustering Region) étant la plus fréquente.

Comme le gène Bcl2 passe alors sous le contrôle du promoteur des chaînes lourdes, la protéine Bcl2 se trouve ainsi surexprimée ce qui induit une inhibition de l'apoptose et une augmentation de la survie des lymphocytes B.

#### b. Exemple d'un LNH agressif : le lymphome B diffus à grandes cellules

Ici, le gène Bcl6 porté par le chromosome 3 peut être impliqué dans plusieurs translocations réciproques, notamment avec les gènes des chaînes lourdes sur le chromosome 14 (t(3 ;14)) et les gènes des chaînes légères sur les chromosomes 2 et 22 (t(2 ;3) et t(3 ;22)). Les réarrangements impliquant Bcl6 sont présents dans 35% des DLBCL [17].

Bcl6 assure la différenciation B terminale des centrocytes et centroblastes mais n'est pas exprimé dans les cellules B immatures de la moelle osseuse. Les translocations du gène Bcl6 avec des gènes des immunoglobulines conduisent à une dérégulation de l'expression de Bcl6 bloquant alors la différenciation des cellules B dans les centres germinatifs.



## 5. Diagnostic et bilan initial

### a. Examen clinique

Les principaux signes cliniques d'un LNH diffèrent en fonction de sa présentation indolente ou agressive.

Dans les LNH indolents, l'évolution chronique permet à l'état général d'être le plus souvent conservé. Survenant davantage chez les patients âgés, ceux-ci rapportent la présence d'adénopathies superficielles, le plus souvent non douloureuses et non inflammatoires, accompagnées ou non d'une splénomégalie ou d'une hépatomégalie non connues auparavant. L'examen clinique peut montrer un syndrome anémique, hémorragique ou encore d'hyperviscosité avec parfois des complications neurologiques.

En revanche, l'évolution des LNH agressifs est davantage subaigüe et les signes cliniques sont beaucoup plus marqués. Les adénopathies grossissent volontiers rapidement et deviennent douloureuses et inflammatoires. Le plus souvent, l'état général est altéré et le patient décrit la présence de signes généraux : amaigrissement inexplicable de plus de 10% en moins de six mois, fièvre supérieure à 38°C depuis plus de huit jours et sueurs nocturnes profuses (obligeant le patient à changer de vêtements durant la nuit). Dans les LNH agressifs, les manifestations extra-ganglionnaires (ORL, cutanées, neurologiques, testiculaires...) ainsi que les adénopathies profondes sont fréquentes et peuvent être révélées par des signes de compression des organes voisins et doivent être recherchées à l'examen clinique ou par l'imagerie.

### b. Biologie

Sur le plan biochimique, la présence d'un syndrome inflammatoire biologique non expliqué, de lactate deshydrogénase (LDH) élevées, la présence d'un pic d'allure monoclonale ou d'une hypogammaglobulinémie à l'électrophorèse des protéines plasmatiques ou d'une immunoglobuline monoclonale à l'immunofixation sérique peuvent également être des points d'appel à la recherche d'un lymphome.

Sur le plan hématologique, la présence de cytopénie(s) ou d'une hyperlymphocytose à la numération-formule sanguine peuvent témoigner dans le premier cas d'une atteinte médullaire et dans le second cas d'une phase leucémique du lymphome.

La réalisation d'un frottis et d'un immunophénotypage sanguins sont indispensables même en l'absence d'hyperlymphocytose afin de rechercher la présence de lymphocytes atypiques. En effet, certains LNH présentent des caractéristiques cytologiques, immunophénotypiques et génétiques particulières qui permettent d'orienter le diagnostic avant même le résultat de l'anatomopathologie.

La ponction ganglionnaire peut, en plus d'être adressée systématiquement à l'anatomopathologie, intéresser le laboratoire d'hématologie qui procédera comme pour le sang aux examens cytologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et de biologie moléculaire.

#### i. Cytologie des LNH B

L'étude cytologique des lymphocytes sanguins, médullaires et ganglionnaires représente bien souvent la toute première étape du biologiste confronté à une suspicion de LNH. Malgré les progrès considérables de la cytométrie en flux et de la biologie moléculaire, la cytologie reste indispensable et nécessaire afin d'orienter et confirmer le diagnostic. L'expérience du cytologiste est alors primordiale et le principal défi est d'affirmer le caractère malin des lymphocytes qu'il observe. Ceci peut parfois être difficile, en particulier dans les lymphocytoses réactionnelles avec présence de lymphocytes hyperbasophiles dans le sang (mononucléose infectieuse, rubéole...).

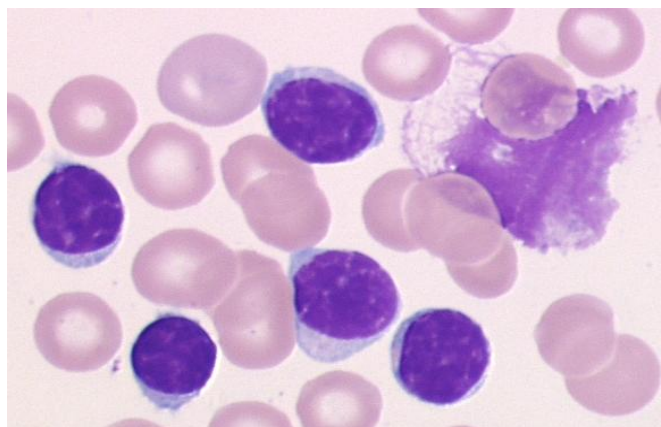
L'infiltration médullaire est inconstante et la fréquence varie selon le type de LNH et son agressivité.

La cytologie ganglionnaire est la plus informative à condition d'obtenir un étalement de bonne qualité et représentatif du ganglion suspect.

Dans les lymphomes agressifs, le LCR et le liquide pleural sont également fréquemment envahis par les cellules lymphomateuses et la cytologie après concentration des éléments devient indispensable devant toute suspicion d'envahissement méningé ou pleural.

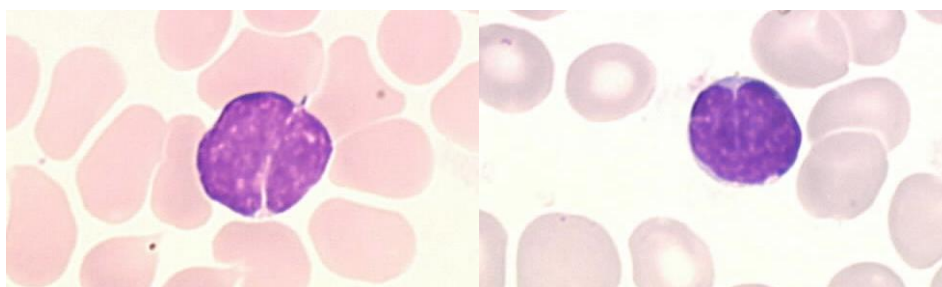
L'hétérogénéité des LNH s'illustre par la grande diversité des lymphocytes en cytologie. Néanmoins, certains aspects sont très évocateurs de certains LNH. Voici quelques exemples de cytologies typiques.

- Dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), l'hyperlymphocytose est systématique et peut être très élevée en fonction du moment du diagnostic. Le clone B représente toujours plus de 5 G/L. Les lymphocytes sont monomorphes, de petite taille, à chromatine mottée et mature, et au rapport nucléocytoplasmique élevé. Il y a moins de 10% de prolymphocytes (lymphocytes de plus grande taille et nucléolés) et moins de 3% de paraimmunoblastes. Les formes atypiques présentent plus de 15% d'atypies (lymphoplasmocytes ou lymphocytes à noyaux encochés). De plus, la présence d'ombres de Gumprecht est très évocatrice : ce sont des cellules lysées lors de la réalisation du frottis qui correspondent à une fragilité cellulaire (figure 13).



**Figure 13 : Lymphocytes de LLC et ombre de Gumprecht<sup>1</sup>**

- Dans le lymphome folliculaire, la phase leucémique est relativement rare et n'apparaît que dans les stades les plus avancés. Les lymphocytes impliqués sont des centrocytes : ils sont de petite taille, à haut rapport nucléocytoplasmique, la chromatine est condensée et le noyau est souvent encoché, clivé ou replié et ne présente pas de nucléoles (figure 14).

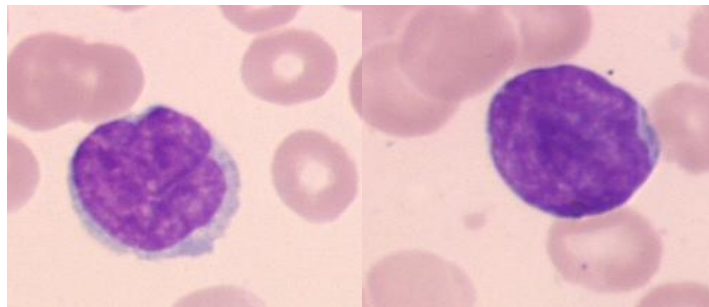


**Figure 14 : Lymphome folliculaire<sup>1</sup>**

---

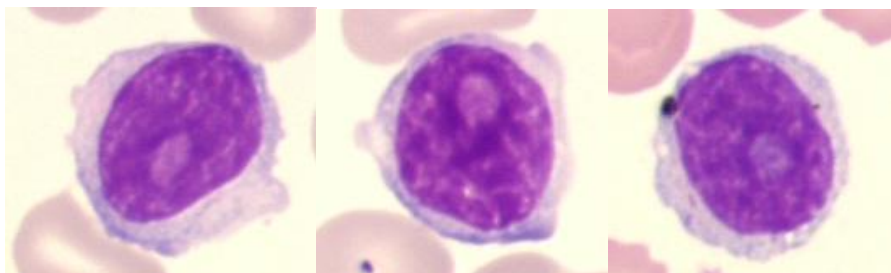
<sup>1</sup> Crédits photos : Trimoreau F. Les lymphomes B vus par le cytologiste. Laboratoire d'Hématologie, CHU Limoges.

- Dans le lymphome du manteau, l'hyperlymphocytose est modérée. Les lymphocytes sont de taille moyenne, à haut rapport nucléocytoplasmique, la chromatine est plus lâche et le noyau plus irrégulier, d'aspect « cabossé », présentant parfois de petites encoches. Deux variantes principales existent : la forme « blastoïde », caractérisée par des lymphocytes de plus grande taille, nucléolés et dont la chromatine est fine et d'allure blastique, et la forme « pseudo prolymphocytaire » montrant des prolymphocytes sur le frottis (figure 15).



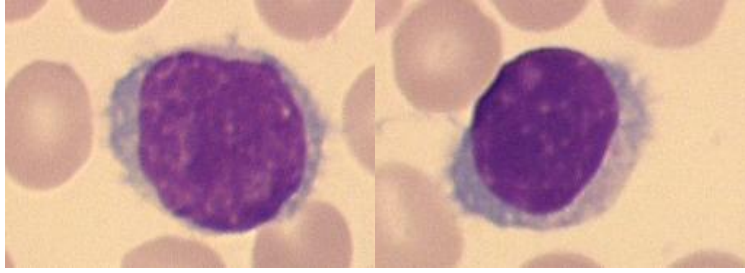
**Figure 15 : Lymphome du manteau<sup>1</sup>**

- Dans la leucémie à prolymphocytes, l'hyperlymphocytose est majeure et progresse rapidement, constituée de plus de 55% de prolymphocytes. La cellule est de grande taille, à rapport nucléocytoplasmique élevé, à noyau arrondi ou ovalaire dont la chromatine est condensée et présentant un nucléole très marqué (figure 16).

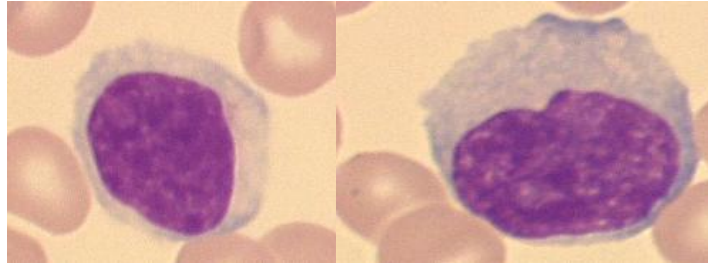


**Figure 16 : Leucémie à prolymphocytes<sup>1</sup>**

- Dans le lymphome de la zone marginale splénique, les lymphocytes sont dits « vilieux » : de petite taille, au noyau arrondi et à chromatine condensée, ils présentent surtout des villosités cytoplasmiques typiques (figure 17). L'hyperlymphocytose est modérée. Dans les lymphomes de la zone marginale non vilieux, on trouve un contingent de lymphocytes d'allure « monocytoïdes », un faible pourcentage de lymphocytes vilieux (< 20%) et quelques lymphoplasmocytes (figure 18).

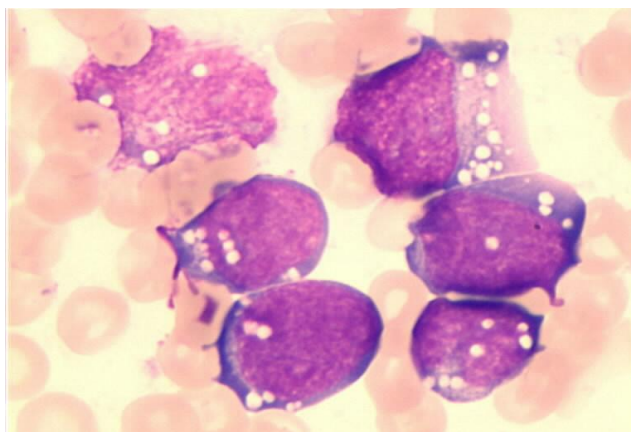


**Figure 17 : Lymphome de la zone marginale splénique à lymphocytes villeux<sup>1</sup>**



**Figure 18 : Lymphome de la zone marginale splénique : cellule monocytoïde (à gauche) et lymphoplasmocyte (à droite)<sup>1</sup>**

- Dans le lymphome de Burkitt, LNH très agressif mettant en jeu le pronostic vital, la présence de lymphocytes tumoraux dans le sang n'est pas systématique. On observe néanmoins une érythromyélocémie importante. En revanche, lorsque la moelle osseuse est envahie, l'infiltrat est massif et constitué de lymphocytes très basophiles, de taille moyenne, à haut rapport nucléocytoplasmique, à chromatine blastique et criblés de vacuoles cytoplasmiques. Les images de mitoses sont très nombreuses et témoignent de l'intensité de la prolifération tumorale (figure 19).



**Figure 19 : Lymphome de Burkitt<sup>1</sup>**

## ii. Immunophénotypage des LNH B

L'immunophénotypage est un examen essentiel dans le diagnostic des LNH. Il est également d'une utilité majeure pour l'identification de cibles thérapeutiques, en particulier en recherchant l'expression du CD20 à la surface des cellules tumorales en vue d'un traitement par rituximab. Il peut être réalisé sur le sang, la moelle osseuse, l'aspiration ganglionnaire, le LCR, le liquide pleural...

Une première étape de sélection des lymphocytes est indispensable grâce au CD45 et au CD19. Puis il convient de rechercher une clonalité sur les cellules d'intérêt grâce au marquage de surface kappa et lambda. L'immunophénotypage de certains LNH étant caractéristique, l'utilisation de panels d'anticorps permet ainsi d'orienter et d'aboutir à un diagnostic.

Dans le tableau 1 sont présentées les principales caractéristiques immunophénotypiques des LNH B les plus fréquents.

	LLC	FL	SMZL/SLVL	HCL	MCL	DLBCL	LB
CD19	+	+ (diminué)	+	+	+	+	+
CD5	+	-	-(+)	-	-	-(+)	-
CD10	-	+	-	-(+)	-	+/-	+
CD23	+	-	-	-	-	-(+)	-
sIg	faible/-	faible/-	+	+	+	+/-	+
CD79b	faible/-	+	+	+	+	+	+
CD22	faible/-	faible/-	+	+	+	+	+
CD103	-	-	-(+)	+	-	-	-
CD25	-(+)	-	+/-	+	-	-(+)	-
CD20	faible	+	+/-	+	+	+/-	+
CD11c	-(+)	-	+/-	+	-	-	-
FMC7	-	+/-	+	+	+/-	+/-	-(+)
CD43	+	-	-	+	+	-(+)	-

**Tableau 1 : Caractéristiques immunophénotypiques des principaux LNH B (sIg : immunoglobuline de surface, LLC : leucémie lymphoïde chronique, FL : lymphome folliculaire, SMZL : lymphome splénique de la zone marginale, SLVL : lymphome splénique à lymphocytes villeux, HCL : hairy-cell leukemia ou leucémie à tricholeucocytes, MCL : lymphome du manteau, DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules, LB : lymphome de Burkitt) [18]**

En 1994, les travaux de E. Matutes ont grandement facilité le diagnostic des LLC en cytométrie en créant un score basé sur cinq marqueurs (CD5, CD23, FMC7, CD22 et immunoglobuline de surface, sIg) [19]. Ce score, allant de 0 à 5, a ensuite été enrichi en 1997 par E.J. Moreau grâce au remplacement du CD22 par le CD79b et a permis d'améliorer la sensibilité [20]. Un score supérieur ou égal à 4 sur 5 est en faveur du diagnostic de LLC (tableau 2).

Antigènes membranaires	Points attribués	
	1	0
CD5	+	-
CD23	+	-
FMC7	-	+
Immunoglobuline de surface	Faible intensité	Intensité moyenne ou forte
CD79b ou CD22	Faible ou négatif	Moyen ou fort

**Tableau 2 : Score de Matutes [6]**

### iii. Cytogénétique et biologie moléculaire des LNH B

Comme nous l'avons vu précédemment, un grand nombre d'anomalies génétiques sont fréquemment retrouvées dans certains LNH, la majorité de ces anomalies consistant en des translocations réciproques. Le plus souvent, ces translocations impliquent les gènes des immunoglobulines avec des oncogènes.

Les progrès des techniques de cytogénétique (cytogénétique conventionnelle, hybridation in situ fluorescente...) et de biologie moléculaire (PCR, RT-PCR...) ont ainsi considérablement changé le diagnostic d'un grand nombre de LNH.

Le tableau 3 résume les principales translocations retrouvées dans les LNH B ainsi que leurs fréquences et les gènes mis en jeu.

NHL histologic type	Translocation	% of cases affected	Proto-oncogene involved	Mechanism of proto-oncogene activation	Proto-oncogene function
Lymphoplasmacytic lymphoma	t(9;14)(p13;q32)	50%	<i>PAX-5</i>	Transcriptional deregulation	Transcription factor regulating B-cell proliferation and differentiation
Follicular lymphoma	t(14;18)(q32;q21) t(2;18)(p11;q21) t(18;22)(q21;q11)	90%	<i>BCL-2</i>	Transcriptional deregulation	Negative regulator of apoptosis
Mantle cell lymphoma	t(11;14)(q13;q32)	70%	<i>BCL-1/ cyclin D1</i>	Transcriptional deregulation	Cell cycle regulator
MALT lymphoma	t(11;18)(q21;q21) t(1;14)(p22;q32)	50% rare	<i>API2/MLT</i> <i>BCL-10</i>	Fusion protein Transcriptional deregulation	API2 has antiapoptotic activity Anti-apoptosis (?)
Diffuse large B-cell lymphoma	der(3)(q27)	35%	<i>BCL-6</i>	Transcriptional deregulation	Transcriptional repressor required for GC formation
Burkitt lymphoma	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p11;q24) t(8;22)(q24;q11)	80% 15% 5%	<i>c-MYC</i>	Transcriptional deregulation	Transcription factor regulating cell proliferation and growth

**Tableau 3 : Principales translocations dans les LNH B [21]**

### c. Anatomopathologie

Le diagnostic des LNH repose sur l'examen anatomopathologique d'une biopsie ganglionnaire ou du tissu infiltré. La cytoponction à l'aiguille fine peut être réalisée dans un contexte d'urgence afin d'obtenir une orientation diagnostique rapide, mais, en dehors de ce cas, la biopsie doit être privilégiée car elle permet l'analyse de la structure du ganglion dans son ensemble [6]. Plusieurs fragments sont créés, pour la cytologie, les immunomarquages, la biologie moléculaire (recherche de clonalité B ou T, réarrangements chromosomiques) et la cytogénétique.

Une relecture par un second anatomopathologiste est désormais recommandée afin de confirmer le diagnostic initial.

### d. Bilan d'extension

Une fois le diagnostic établi, le bilan est complété par la recherche d'autres localisations lymphomateuses afin d'établir le pronostic et le traitement.

La réalisation d'une biopsie ostéo-médullaire (BOM), souvent complétée d'un myélogramme, en particulier en présence de cytopénie(s), permettent de rechercher une infiltration médullaire par le lymphome. La cytologie ainsi que l'immunohistochimie dans le premier cas ou la cytométrie en flux (CMF) dans le second cas sont indispensables.



La ponction lombaire avec cytologie et biochimie du liquide céphalo-rachidien (LCR) est à réaliser en cas de suspicion d'atteinte méningée, le plus souvent dans le cas des lymphomes agressifs.

Les examens d'imagerie sont d'une importance majeure. La réalisation d'un scanner cervico-thoraco-abdomino-pelvien avec mesure des lésions tumorales sur les deux axes doit être systématique et servira de référence initiale lors du suivi de la réponse au traitement. [6] Le TEP-scanner présente un intérêt particulier dans les lymphomes B diffus à grandes cellules du fait de leur agressivité ainsi que dans les lymphomes folliculaires du sujet jeune avec indication à la chimiothérapie [22]. L'IRM peut être proposée dans les LNH avec des localisations osseuses et du système nerveux central.

En déterminant le nombre et la localisation des foyers tumoraux, le bilan d'extension permet de classer le lymphome en quatre stades, définis lors de la conférence d'Ann Arbor en 1970 (tableau 4). Initialement établie pour le lymphome de Hodgkin, elle s'applique également aux LNH.

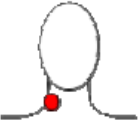

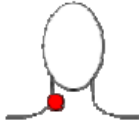
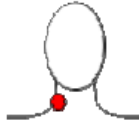
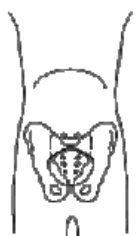
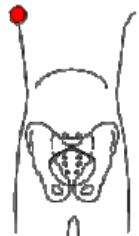
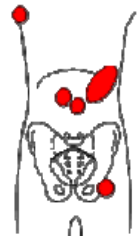

	Stade I	Stade II	Stade III	Stade IV
				
				
<b>stade I</b>	Atteinte d'une seule aire ganglionnaire sus ou sous-diaphragmatique			
<b>stade II</b>	Atteinte de deux ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme			
<b>stade III</b>	Atteinte ganglionnaire de part et d'autre du diaphragme			
<b>stade IV</b>	Atteinte viscérale à distance d'un groupe ganglionnaire (médullaire, hépatique, pulmonaire...)			

Tableau 4 : Classification d'Ann Arbor [6]

A cette stadification s'ajoutent trois critères :

- La lettre A en l'absence de signes généraux (fièvre, sueurs nocturnes, amaigrissement) ou la lettre B en présence d'au moins un de ces signes généraux
- La lettre a en l'absence de signes biologiques d'évolutivité ou la lettre b en présence de signes biologiques d'évolutivité (vitesse de sédimentation)
- La lettre E en présence d'une atteinte viscérale extra-ganglionnaire contigüe à une atteinte ganglionnaire

#### e. Bilan pré-thérapeutique

Le bilan pré-thérapeutique doit associer au minimum un bilan biologique complet ainsi que des mesures de préservation de la fertilité.

Sur le plan biologique, il doit être complété par : le dosage des LDH sériques, de la  $\beta_2$ -microglobuline ( $\beta_2m$ ), le bilan de syndrome de lyse (uricémie, calcémie, phosphorémie), la créatininémie et la mesure de la clairance, la protéine C-Réactive (CRP), le bilan hépatique (transaminases, phosphatases alcalines, GGT, bilirubine directe et indirecte), l'électrophorèse et l'immunofixation des protéines plasmatiques, un test de grossesse chez la femme en âge de procréer, les sérologies hépatite B, hépatite C, cytomégalovirus (CMV), EBV et VIH au minimum, les sérologies HTLV 1 et 2 en cas de lymphome T, le groupage sanguin ABO et Rhésus, le groupage HLA chez les patients de moins de 65 ans dans l'hypothèse d'une allogreffe.

L'utilisation de certaines chimiothérapies en particulier d'alkylants peut conduire à une stérilité transitoire ou définitive et la préservation de la fertilité doit être systématiquement proposée à tous les patients en âge de procréer. Chez l'homme, une cryoconservation du sperme afin de conserver les gamètes est possible avant le début du traitement au centre d'étude et de conservation du sperme (CECOS). Chez la femme, la cryoconservation des ovaires est proposée aux femmes de moins de 30 ans et la contraception indispensable.

D'autres examens complémentaires peuvent être nécessaires : bilan dentaire, explorations fonctionnelles respiratoires, ou encore électrocardiogramme et évaluation de la fraction d'éjection du ventricule gauche en cas d'utilisation d'anthracyclines.

## 6. Pronostic

### a. LNH agressifs

En 1993, un score pronostique international a été proposé d'après les informations recueillies sur 2031 patients de tous âges atteints d'un LNH agressif et traités par une association de chimiothérapies comportant de la doxorubicine [23]. Cinq paramètres ont pu être identifiés et ont permis d'établir le score IPI (International Prognostic Index) (tableau 5).

Facteurs	0 point	1 point
Age (années)	$\leq 60$	$\geq 60$
Stade selon Ann Arbor	I ou II	III ou IV
Score de performance de l'OMS	0 ou 1	$\geq 2$
Taux de LDH	Normal	Supérieur à la norme du laboratoire
Nombre d'atteintes extra-ganglionnaires	$\leq 1$	$> 1$

**Tableau 5: Index Prognostic International (IPI) [23]**

Quatre groupes pronostiques ont ainsi été définis en fonction du score obtenu. Les survies observées sont résumées dans le tableau 6. [23]

Pour les patients de moins de 60 ans, l'IPI « ajusté à l'âge » (IPI<sub>aa</sub>) a été développé et ne prend plus en compte l'âge et le nombre de sites extra-ganglionnaires atteints.

Groupe pronostique	IPI	Survie à 2 ans (%)	Survie à 5 ans (%)
Faible risque	0 ou 1	84	73
Faible risque intermédiaire	2	66	51
Haut risque intermédiaire	3	54	43
Haut risque	4 ou 5	34	26

**Tableau 6 : Survie moyenne selon le groupe pronostic tous âges confondus [23]**

## b. LNH indolents

En ce qui concerne le lymphome folliculaire, le plus fréquent des lymphomes indolents, plusieurs scores ont été mis au point dont le FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index), le FLIPI 2 (FLIPI réactualisé en 2009) et le GELF (index de forte masse tumorale établi par le Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires) (tableau 7).

### Index FLIPI 2 (2009) : nouvel index pronostic international des lymphomes folliculaires :

<b>Age :</b> > à 60 ans.
<b>Hémoglobine :</b> <12 g/dl.
<b>Moelle osseuse :</b> envahie.
<b>Béta-2-microglobuline :</b> > à la norme du laboratoire.
<b>Diamètre de la plus grosse masse :</b> > à 6 cm (L'avantage étant de ne plus détailler les sites anatomiques).
<b>0 à 1 point par critères :</b> FLIPI2 de 0 à 5.

Tableau 7: Exemples d'index pronostics pour les lymphomes folliculaires [22]

## B. Le lymphome lymphoplasmocytaire / la maladie de Waldenström

### 1. Définition et classification

La première description de la maladie a été faite en 1944 par Jan Waldenström qui rapportait une anémie sévère, des épistaxis, des adénopathies, une vitesse de sédimentation élevée, une hypofibrinogénémie et une hypergammaglobulinémie. [24]

Deux systèmes de classification de la MW existent, l'un dit « de consensus » défini par le second groupe de travail international sur la MW en 2002, le second dit « originel » par l'équipe de la Mayo Clinic (tableau 8). Dans les deux cas, la maladie de Waldenström (MW) symptomatique est définie comme étant un lymphome lymphoplasmocytaire (LPL) infiltrant la moelle osseuse, quel que soit le pourcentage, associé à la présence d'une immunoglobuline monoclonale de type IgM quel que soit son taux.

La classification consensus distingue les MW symptomatiques et asymptomatiques. Dans les deux cas, elle n'exige pas de pourcentage d'infiltration médullaire ni de taux d'IgM monoclonale minimums. Le diagnostic de MW peut donc être posé quel que soit le taux de l'IgM monoclonale du moment qu'un infiltrat médullaire par un LPL est présent. Les patients présentant une IgM monoclonale sans infiltration médullaire par un lymphome doivent être considérés comme des MGUS à IgM (gammopathies monoclonales de signification indéterminée). [25]

En revanche, la classification originelle différencie les MGUS à IgM des « smoldering MW » de la même façon que pour le myélome multiple car elle reflète des différences de pronostic. En effet, les « smoldering MW » possèdent un risque de transformation en MW symptomatique dix fois supérieur à celui des MGUS à IgM. Cette classification définit un seuil à 3g/dL d'IgM monoclonale et à 10% d'infiltration lymphoplasmocytaire de la moelle osseuse pour différencier une MGUS à IgM d'une « smoldering MW » lorsque le patient ne présente aucun signe clinique. [26]

<b>Consensus classification</b>	
Ig-MGUS	Ig protein but no LPL cells in the BM*
Asymptomatic WM	Any level of Ig and any percentage of LPL cells in the BM with no symptoms of disease requiring therapy
Symptomatic WM	Any level of Ig and any percentage of LPL cells in the BM with symptoms of disease or end organ damage such as hyperviscosity, anemia, B symptoms, bulky lymph nodes, neuropathy, or amyloidosis
<b>Original classification</b>	
Ig-MGUS	Ig < 3 g/dL or LPL cells < 10% in the BM but no symptoms or signs of end organ damage
Smoldering WM	Ig ≥ 3 g/dL or LPL cells ≥ 10% in the BM but no symptoms or signs of end organ damage
Symptomatic WM	Any level of Ig and any percentage of LPL cells in the BM with symptoms of disease or end organ damage such as hyperviscosity, anemia, B symptoms, bulky lymph nodes, neuropathy, or amyloidosis

**Tableau 8 : Classification de la maladie de Waldenström et des MGUS à IgM [27]**

## 2. Epidémiologie

Les LPL/MW représentent environ 1.4% des LNH B selon les données de l'OMS. Les hommes sont environ deux fois plus touchés que les femmes et l'incidence augmente avec l'âge, l'âge médian au diagnostic étant de 63 ans. [9] La MW est également plus fréquente chez les sujets « blancs » que chez les sujets « noirs ». De plus, l'estimation de la prévalence est délicate du fait de distinctions parfois difficiles avec les MGUS à IgM et les « smoldering WM ».

Les principaux facteurs de risque reconnus sont :

- La présence d'une IgM-MGUS préexistante : le risque de développer une MW est alors 46 fois supérieur à celui de la population générale [28]
- La notion de terrain familial : dans la plupart des cas, la MW est une maladie sporadique mais les patients dont les parents au premier degré étaient atteints d'une MW ont un risque supérieur de développer une MW

## 3. Signes cliniques

Le LPL infiltre le plus souvent la moelle osseuse, les ganglions ou la rate tandis que les atteintes extra-ganglionnaires et la phase leucémique sont rares.

Dans la MW et le LPL, les signes cliniques sont principalement liés à :

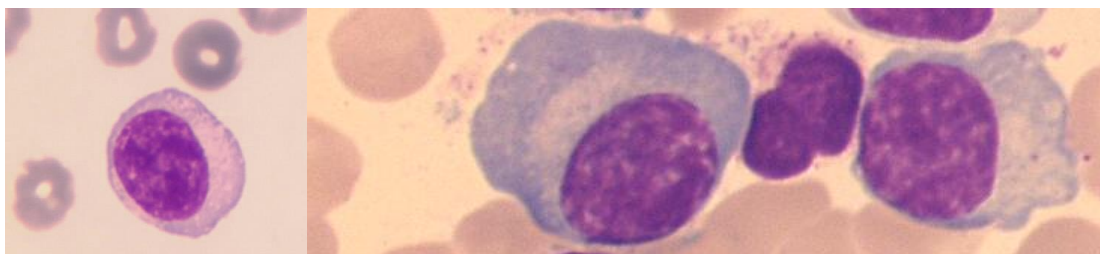
- l'envahissement médullaire, constant dans la MW : cytopénies et en particulier anémie, mais un infiltrat tumoral ganglionnaire est également possible et responsable d'adénopathies et/ou d'hépatosplénomégalie, de symptômes B (fièvre, sueurs nocturnes, amaigrissement...)
- l'immunoglobuline monoclonale de type IgM : syndrome d'hyperviscosité (céphalées, épistaxis, troubles visuels et auditifs...), anémie (par hémodilution), activité cryoglobuline ou agglutinine froide de l'IgM, neuropathies périphériques (par activité anti-MAG de l'IgM (Myelin-Associated Glycoprotein)), amylose...

#### 4. Diagnostic

La démonstration de la présence d'un infiltrat médullaire est donc indispensable, que ce soit par la biopsie ostéo-médullaire ou par le myélogramme.

La BOM montre une infiltration de type interstitielle mais également nodulaire ou diffuse composée de petits lymphocytes matures, de lymphoplasmocytes et de plasmocytes.

Au myélogramme, on observe un frottis de richesse normale ou diminuée avec infiltrat lymphocytaire B présentant également toutes les formes allant du lymphocyte au plasmocyte (figure 20) et la présence de nombreux mastocytes morphologiquement normaux est un bon signe évocateur.



**Figure 20 : Maladie de Waldenström : lymphoplasmocyte (à gauche) et plasmocytes (à droite)<sup>1</sup>**

Le profil immunophénotypique n'est pas spécifique. Les cellules tumorales sont positives pour les marqueurs B (CD19+, CD20+, CD22+ et CD79a+), pour le FMC7 et le CD27. Le CD38 et le CD25 sont souvent positifs. Elles expriment une IgM de surface, certaines d'entre elles également une IgD, et sont CD27+. En revanche, elles sont CD5-, CD23-, CD10-, CD103- et CD11c- (tableau 9). Le score de Matutes est donc inférieur à 3. Il existe une minorité de cas (environ 5%) où les cellules expriment le CD5 faiblement mais ces cas doivent avant tout faire rechercher une LLC et un lymphome du manteau bien plus fréquents. Les plasmocytes sont CD138+ et expriment la même IgM en intracytoplasmique. [25] En revanche, leur profil immunophénotypique est différent de celui des plasmocytes du myélome avec en règle générale une expression en surface du CD19 et pas du CD56.

<ul style="list-style-type: none"> <li>● IgM monoclonal gammopathy of any concentration</li> <li>● Bone marrow infiltration by small lymphocytes showing plasmacytoid/plasma cell differentiation</li> <li>● Intertrabecular pattern of bone marrow infiltration</li> <li>● Surface IgM<sup>+</sup>, CD5<sup>±</sup>, CD10<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD23<sup>-</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, FMC7<sup>+</sup>, CD103<sup>-</sup>, CD138<sup>-</sup> immunophenotype*</li> </ul>
<p>* Variations from this immunophenotypic profile can occur. However, care should be taken to satisfactorily exclude other lymphoproliferative disorders. This is most relevant in CD5<sup>+</sup> cases, for which chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma require specific exclusion before a diagnosis of WM can be made.</p>

Tableau 9 : Critères diagnostiques de la maladie de Waldenström [25]

## 5. Anomalies cytogénétiques et statut mutationnel des IGHV

Le caryotype est complexe dans environ 30% des cas et les anomalies cytogénétiques nombreuses mais aucune n'est spécifique de la MW car elles sont également présentes dans la LLC (del11q, del13q14, trisomie 12...) et les lymphomes de la zone marginale (trisomie 4, trisomie 3 ...). La principale anomalie cytogénétique identifiée est la délétion 6q (en 6q16 et 6q21 notamment), retrouvée dans 31 à 55% des cas de MW. [29]

L'étude des IGHV montre un profil muté dans la majorité des MW, le taux de mutation étant supérieur à 5% le plus souvent. Ceci suggère que les cellules tumorales sont sous l'influence d'une stimulation antigénique mais sans commutation de classe des IgM vers les IgG. Les cellules tumorales pourraient donc être des cellules B dont les mutations des IGHV ont conduit à la perte du mécanisme de commutation isotypique avec persistance de l'IgM. De plus, la famille des IGHV3 est impliquée dans 77% des cas, le plus souvent de type IGHV3-23 et IGHV3-7. [30]

## 6. Diagnostic différentiel

Il est nécessaire d'éliminer les autres LNH B qui peuvent s'accompagner d'une IgM monoclonale et/ou présenter des caractéristiques lymphoplasmocytaires : lymphomes de la zone marginale, LLC, lymphome du manteau...

Le diagnostic différentiel avec le myélome multiple ne pose généralement pas de problème particulier, du fait de l'extrême rareté des myélomes à IgM, d'une présentation clinique particulière (en particulier les lésions ostéolytiques dans le myélome), d'un immunophénotypage et de caractéristiques cytogénétiques bien différentes. Soulignons aussi par ailleurs l'existence de très rares lymphomes lymphoplasmocytaires IgG ou IgA sécrétants, qui peuvent mimer un myélome (pic monoclonal à IgG ou IgA très élevé dans le sang)



jusqu'à l'étude de la moelle qui montre alors un infiltrat lymphoplasmocytaire et non plasmocytaire. [31]

La LLC, le lymphome folliculaire et le lymphome du manteau peuvent également rentrer dans le cadre du diagnostic différentiel d'une MW lorsqu'ils se présentent avec une différenciation lymphoplasmocytaire. Néanmoins ces trois LNH B possèdent des caractéristiques propres le plus souvent suffisantes. La LLC est diagnostiquée grâce à un score de Matutes supérieur ou égal à 4, le CD5+ étant positif. Les lymphocytes du lymphome du manteau sont également CD5+ et hyperexpriment la cycline D1. Le lymphome folliculaire est caractérisé par la présence de petits lymphocytes CD10+.

La principale difficulté vient des lymphomes de la zone marginale (MZL), en particulier du lymphome de la zone marginale ganglionnaire (NMZL). Bien que les NMZL soient par définition de localisation ganglionnaire, la plupart d'entre eux présentent une atteinte extra-ganglionnaire, médullaire et splénique notamment, en particulier dans les stades avancés, ainsi qu'une IgM monoclonale. De plus, il existe une grande hétérogénéité morphologique de la population lymphomateuse et la présence de lymphoplasmocytes est fréquente. L'immunophénotypage montre des cellules B exprimant le CD19, le CD20, le CD79a et l'IgM de surface mais l'IgD est le plus souvent négative. Le CD5, le CD23, le CD10 et la cycline D1 sont négatifs. En revanche, le CD43 est positif dans environ 50% des cas.

C'est donc lorsqu'un MZL se présente avec des signes de différenciation lymphoplasmocytaire et/ou associé à une IgM, ou encore lorsque le LPL infiltre également d'autres organes que les difficultés diagnostiques se posent. Le LPL/MW a été considéré par certains auteurs comme une variante morphologique des MZL [32] mais l'étude des IGHV sur des prélèvements médullaires de ces deux lymphomes a montré qu'il s'agissait bien de deux entités distinctes. Alors que dans les LPL/MW les gènes IGHV3-23 et IGHV3-7 sont les plus fréquents et présentent un taux de mutations élevé, on retrouve plus fréquemment les gènes IGHV1-2 et IGHV4 peu ou pas mutés dans les lymphomes de la zone marginale splénique (SMZL), et la famille des IGHV3 non mutés le plus souvent dans les NMZL. [33]

L'étude de la mutation L265P de MYD88 pourrait constituer un nouvel outil pour le diagnostic différentiel de la MW face aux MZL (voir plus bas).

## 7. Pronostic et traitement

La médiane de survie des patients atteints de MW est d'environ 5 ans. Les facteurs pronostiques adoptés de manière consensuelle sont l'anémie, la thrombopénie (qui reflètent le degré d'infiltration médullaire), le taux d'IgM, le taux de  $\beta$ 2-microglobuline et l'âge.

Les patients asymptomatiques ne nécessitent pas d'être traités, une simple surveillance est recommandée.

En présence de signes cliniques, le traitement pourra être symptomatique, en particulier par plasmaphérèses pour corriger les complications dues à l'IgM comme le syndrome d'hyperviscosité, mais aussi curatif afin de cibler le lymphome lui-même et son envahissement médullaire. La chimiothérapie repose principalement sur le chlorambucil par voie orale, le rituximab ou encore l'association rituximab-dexaméthasone-cyclophosphamide. [34]

### C. Lymphocytose B monoclonale (MBL)

#### 1. Historique

Les progrès considérables de la cytométrie en flux ont permis de détecter à des seuils de plus en plus bas la présence de clones B circulants

En 1984, les travaux de Han T. et al rapportent l'observation de 20 patients présentant une leucémie lymphoïde chronique (LLC) au stade 0 selon la classification de Rai et qui ne développeront aucune évolution ni clinique ni biologique durant toute la période de suivi, allant de 6.5 à 24 ans avec une moyenne de 10 ans. Les auteurs décrivent cette première description comme une « variante bénigne » de LLC et proposent alors de la dénommer « benign monoclonal B cell lymphocytosis » (BMBL, ou « lymphocytose B monoclonale bénigne ») [35].

Plusieurs appellations se sont succédé, dont notamment « B monoclonal lymphocytosis of undetermined significance » (MLUS ou « lymphocytose B monoclonale de signification indéterminée », par analogie aux MGUS, gammopathies monoclonales de signification indéterminée) et « smoldering CLL » (« LLC asymptomatique »).

Désormais, c'est la dénomination « lymphocytose B monoclonale » (ou MBL pour « monoclonal B-cell lymphocytosis) qui a été retenue.

## 2. Critères diagnostiques et classification

Les critères diagnostiques ont été définis en 2005 par l'International Familial CLL Consortium puis révisés en 2008 par l'International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) [36]. Cette clarification a été rendue nécessaire du fait de la reconnaissance de la MBL comme une nouvelle entité et également du fait des modifications des critères diagnostiques de la LLC. En effet, auparavant la LLC requérait une lymphocytose totale supérieure à 5 G/L. Depuis ces nouvelles recommandations, c'est désormais la lymphocytose B qui doit être supérieure à 5 G/L et non plus la lymphocytose totale. Ainsi, dans une étude sur 112 patients diagnostiqués LLC stade 0 selon la classification de Rai, 42% d'entre eux ont été reclassés en MBL [37]. Les MBL sont donc définies par opposition aux LLC et un des critères essentiels est la présence d'une lymphocytose B inférieure à 5 G/L.

De plus, comme son nom l'indique, cette population lymphocytaire B doit être monoclonale, kappa ou lambda, définie :

- par un rapport kappa/lambda supérieur à 3 (clone kappa) ou inférieur à 0.3 (clone lambda)
- ou par la présence de plus de 25% de lymphocytes B présentant une perte ou une diminution de l'expression de l'immunoglobuline de surface
- ou par la mise en évidence d'une clonalité des régions variables des chaînes lourdes des immunoglobulines.

Cette monoclonalité doit être si possible recontrôlée à trois mois afin de s'assurer de la persistance du clone.

L'examen clinique doit être strictement normal et en particulier éliminer tout signe clinique ou biologique évocateur d'un LNH B :

- absence d'adénopathies, de splénomégalie ou d'hépatomégalie
- absence de symptômes B : sueurs nocturnes, fièvre, amaigrissement, fatigue
- absence de marqueurs biologiques de LNH, notamment absence d'hyperexpression de la cycline D1, négativité du CD10, etc...

Il est également indispensable de s'assurer de l'absence de tout syndrome infectieux et de maladie auto-immune.

Au sein des MBL, les caractéristiques immunophénotypiques du clone B permettent de différencier trois sous-types.

Le plus fréquent (75% des MBL) comporte les marqueurs typiques de la LLC, à savoir : CD5+, CD23+, CD20 faible, CD79b faible, expression de l'immunoglobuline de surface (sIg) faible. Cette catégorie de MBL est donc dite « LLC-like » par analogie à la LLC. Il ne s'agit donc plus de LLC au stade 0 selon la classification de Rai. C'est dans ce cas que la valeur absolue de la lymphocytose B est primordiale (supérieure ou inférieure à 5 G/L) car c'est elle qui fera le diagnostic entre une MBL et une LLC.

Le second groupe est dit « MBL atypique » en raison de la positivité du CD5 mais de l'expression différente des autres marqueurs de la LLC, le plus fréquemment par un CD23 négatif ou faible, ou encore par la forte expression du CD20, du CD79b ou de l'sIg. Lorsque le CD23 est négatif, un lymphome du manteau doit être éliminé en priorité avant d'affirmer le diagnostic de MBL atypique.

Enfin, le troisième sous-type est dit « non-LLC » : le CD5 est négatif et l'ensemble du profil immunophénotypique évoque une phase leucémique de LNH. Ce groupe nécessite particulièrement de poursuivre le bilan afin d'éliminer formellement un LNH B (TEP-scanner, recherche de translocations, biopsie ostéo-médullaire...), et en cas de négativité, le diagnostic de « MBL non-LLC » pourra être retenu.

Les critères diagnostiques et la classification selon l'IWCLL sont résumés dans le tableau 10. [38]

DIAGNOSTIC CRITERIA
1. Documentation of clonal B-cell population <sup>1</sup> by one or more of following:
a. light chain restriction: <ul style="list-style-type: none"> <li>• overall kappa:lamda ratio &gt;3:1 or &lt;0.3:1 or</li> <li>• greater than 25% of B-cells lacking or expressing low level surface Immunoglobulin</li> </ul>
b. heavy chain monoclonal IGHV rearrangements
2. Presence of a disease specific immunophenotype <sup>2</sup>
3. Absolute B-cell Count <5 x 10 <sup>9</sup> cells/L
4. No other features of a lymphoproliferative disorder or autoimmune disease
a. normal physical exam (no lymphadenopathy or organomegaly)
b. absence of B-symptoms (e.g. fatigue, weight loss, night sweats) attributable to NHL
c. no autoimmune/infectious disease
SUBCLASSIFICATION:
A. CLL Like phenotype
- co-expression of CD5 with CD19; CD20 (dim); and CD23
- light chain restriction with dim surface immunoglobulin expression (very small MBL clones may be oligoclonal and thus not light chain restricted)
B. Atypical CLL phenotype
- co-expression of CD5 with CD19 but CD23 negative or CD20 (bright)
- light chain restriction with moderate to bright surface immunoglobulin expression
- exclude t(11;14) to rule out mantle cell lymphoma
C. Non-CLL phenotype
- CD5 negative
- Express CD20
- light chain restriction with moderate to bright surface immunoglobulin expression

<sup>1</sup>Where possible, repeat assessment should demonstrate the monoclonal B-cell population is stable over 3-month period

<sup>2</sup>In the absence of a disease-specific immunophenotype, a highly skewed kappa:lamda can be the result of a reactive process.

**Tableau 10 : Critères diagnostiques et classification des MBL [38]**

### 3. Epidémiologie

#### a. Prévalence dans la population générale

De nombreuses études se sont attachées à estimer la prévalence de ces clones dans la population générale. Néanmoins, il existe de grandes différences, la prévalence s'étendant de 0.14% à 12%. Les différents résultats de ces études sont résumés dans l'annexe 1.

En 2002, l'équipe de Rawtron a recherché la présence d'une MBL par cytométrie en flux à 4 couleurs sur une population de 910 patients hospitalisés âgés de plus de 40 ans [39]. Ces patients n'avaient aucun antécédent de maladie hématologique, de cancer ou de transplantation, et les paramètres hématologiques (hémoglobine, plaquettes et leucocytes)

étaient normaux. Un clone B de phénotype similaire à celui de la LLC (de type « LLC-like ») a été détecté parmi 32 cas sur 910 soit 3.5%.

En revanche, en utilisant un cytomètre à 8 couleurs, Nieto et al. obtiennent de leur côté une prévalence de 12% (73 cas sur 608 patients) sur une population de plus de 40 ans [40].

La prévalence a également été étudiée dans des populations de donneurs de sang. D'après Rachel et al. [41] entre 2000 et 2002, 7 donneurs sur 5141 (0.14%) ont présenté un clone B, la prévalence atteignant 0.93% chez les plus de 65 ans et 1.47% après 70 ans. Néanmoins, ces prévalences beaucoup plus faibles que dans les autres études peuvent être expliquées par l'âge plus jeune de la population étudiée et surtout par l'utilisation d'une technique de cytométrie en flux à deux couleurs moins sensible.

En effet, la dernière grande étude portant sur 2098 donneurs de sang de plus de 45 ans entre 2010 et 2011 rapporte une prévalence bien supérieure à l'étude précédente et assez inattendue. Ici, un immunophénotypage en 6 couleurs a été utilisée et révèle la présence de 149 cas de MBL (7.1%), se répartissant en 101 MBL LLC-like (67.8%), 23 MBL atypiques (15.4%), 21 MBL non-LLC (14.1%) et 4 (2.7%) possédant deux clones distincts [42]. 75% des ces 149 MBL diagnostiquées possédaient un clone B inférieur à 0.05 G/L (MBL de screening, voir plus bas).

De plus, il existe une nette prédominance masculine. Sur les 32 cas de MBL LLC-like de l'étude Rawstron et al. [39], 21 sont des hommes contre 11 femmes. Ces résultats sont confirmés chez les donneurs de sang de Shim et al.[42] où les hommes représentent 65% (97/149) des MBL détectées contre 35% de femmes. Le sexe-ratio est ainsi estimé à 1,9.

L'ensemble des études confirme l'augmentation de la prévalence avec l'âge, comme dans la LLC. De 3.9% chez les patients âgés de 45 à 54 ans, elle augmente à 8.1% entre 55 et 64 ans et à 10.7% après 65 ans [42].

Au final, les MBL sont principalement représentées par les MBL LLC-like et la prévalence dans la population générale est estimée par consensus entre 3 et 5% [43]. Elle dépend donc :

- De la sensibilité de la cytométrie en flux utilisée, avec laquelle elle augmente
- Du sexe : elle est plus élevée chez les hommes, presque deux fois plus touchés que les femmes

- De l'âge : les sujets atteints de MBL sont deux fois plus nombreux après 65 ans qu'avant 54 ans.

#### b. Prévalence chez les sujets exposés aux déchets toxiques

Les facteurs environnementaux et en particulier les polluants sont de plus en plus incriminés dans la survenue de nombreux cancers.

Dans le cas des MBL, une étude rétrospective à grande échelle a été menée entre 1991 et 1994 sur 1926 patients vivants à proximité d'une zone de stockage de déchets toxiques (dioxine, polychlorobiphényles, métaux, hydrocarbures...) comparativement à une population témoin. 11 d'entre eux (0.57%) ont été diagnostiqués par cytométrie en flux à 2 couleurs comme étant atteints de MBL [44]. D'autres études seraient nécessaires afin d'affirmer la relation entre l'exposition à un environnement toxique et le développement de MBL.

#### c. Prévalence dans les formes familiales de LLC

La notion de terrain familial est désormais acquise dans les LLC et de nombreuses études ont montré un risque de développer une LLC 2 à 7 fois supérieur chez les sujets dont les parents au premier degré sont atteints comparé à la population générale [45]. Néanmoins, bien que des anomalies cytogénétiques récurrentes soient fréquemment retrouvées, aucun gène spécifique n'a été identifié.

Plusieurs études ont montré que la prévalence des MBL dans les familles de LLC était 4 à 5 fois supérieure à celle de la population générale. L'étude de Marti [45] a porté sur les registres familiaux de neuf familles, composées de 33 sujets sains et apparentés au premier degré avec au moins un des 19 sujets atteints de LLC. Parmi ces 33 sujets sains, 6 ont pu être diagnostiqués comme étant des MBL, soit une prévalence de 18%, bien supérieure donc à ce qui est observé dans la population générale quelle que soit l'étude. Cette prévalence élevée a été confirmée dans deux autres séries : 13.5% selon Rawstron et 17% selon Goldin et al. [46,47].

#### 4. Caractéristiques biologiques des MBL

Bien que les MBL possèdent des caractéristiques proches de celles des LLC, en particulier pour les MBL LLC-like, il existe un certain nombre de particularités.

##### a. Taille du clone lymphocytaire B

Les MBL peuvent se répartir en deux sous-groupes en fonction du nombre de cellules clonales B circulantes : les « MBL cliniques » et les « MBL de screening ». L'intérêt essentiel de cette classification est d'être plus adapté à la clinique et au pronostic. En effet, comme décrit dans la suite, ces deux entités correspondent à des présentations clinico-biologiques et des évolutions bien différentes.

Les « MBL cliniques » (ou « high-count MBL ») sont caractérisées par une hyperlymphocytose, laquelle est le plus souvent le motif de réalisation d'un immunophénotypage. Le clone B est alors supérieur à 0.5 G/L (le plus souvent supérieur à 1.5 G/L).

En revanche, les « MBL de screening » (ou « low-count MBL ») sont détectées fortuitement sur des patients sains lors d'immunophénotypages systématiques (notamment dans des protocoles de recherche) et le clone B est inférieur à 0.5 G/L (le plus souvent inférieur à 0.05 G/L). [48]

L'ensemble des caractéristiques de ces deux formes de MBL est résumé dans l'annexe 2.

##### b. Anomalies cytogénétiques

Les LLC présentent certaines anomalies cytogénétiques classiques. Les plus fréquentes sont la délétion 13q14, la trisomie 12, la délétion 11q23 et la délétion 17p13. Selon l'étude de Döhner, les fréquences de ces anomalies sont respectivement de 55%, 16%, 18% et 7% des LLC [49].

Ces anomalies sont également présentes dans les MBL :

- les délétions 13q14, 13q34 et la trisomie 12 sont les plus fréquentes et sont retrouvées à des fréquences comparables à ce qui est observé dans la LLC
- elles sont plus fréquentes dans les MBL cliniques que dans les MBL de screening.



En effet, sur une cohorte de 16 MBL de screening (de type LLC-like), Fazi et al. [50] ont détecté par FISH que 8 patients (50%) portent des anomalies cytogénétiques dont cinq une délétion en 13q14.3 (31.3%), deux en 13q34 (12.5%) et un une trisomie 12 (6.2%).

En revanche, l'étude de Rawstron montre que la délétion 13q14 et la trisomie 12 sont plus fréquentes dans les MBL cliniques que dans les MBL de screening, car elles représentent respectivement 58% et 21% des cas de MBL cliniques (LLC-like également) [51].

Les fréquences similaires de ces anomalies entre les LLC et les MBL cliniques témoignent des liens entre ces deux entités et semblent suggérer que ces évènements génétiques surviennent à un stade précoce du développement des MBL [50].

En revanche, la délétion 17p13 et la délétion 11q23, de mauvais pronostic dans la LLC, sont beaucoup moins fréquentes dans les MBL. Leurs fréquences sont respectivement de 2.3% et 3.6% dans les MBL cliniques et toutes deux nulles dans les MBL de screening [51] contre 7% et 18% des LLC. Ceci laisse donc penser que le clone B d'une MBL clinique acquiert secondairement ces mutations dans les cas rares cas où il évolue vers une LLC.

### c. Mutations des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines

Dans la LLC, la présence de mutations somatiques dans la région variable du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGHV) permet de distinguer deux catégories aux pronostics et évolutions différents : les LLC dont le profil de ces gènes est muté (il y a moins de 98% d'homologie avec la séquence sauvage), qui sont de meilleur pronostic et qui représentent environ 58% des LLC [52], et les LLC « non-mutées » (plus de 98% d'homologie) qui sont associées à une médiane de survie inférieure [53].

De plus, l'analyse du statut mutationnel des IGHV des MBL LLC-like montre deux différences notables avec la LLC.

- D'une part, les MBL sont plus fréquemment associées à un profil muté des IGHV que les LLC. En effet, 70 à 88% des MBL de screening et 90% des MBL cliniques présentent un statut muté contre 58% des LLC. [51,54] Néanmoins, la fréquence des MBL cliniques mutées ne semble pas statistiquement différente de celle des MBL de screening. [48]

- D'autre part, le répertoire des gènes utilisés dans les MBL de screening diffère de celui des LLC. En effet, les MBL de screening sont caractérisées par un répertoire surtout constitué du gène IGHV4-59/61, rarement des gènes IGHV3-23 et IGHV4-34 et une absence du gène IGHV1-69, alors que celui-ci est le plus fréquent dans les LLC non mutées. [48,49,54] En revanche, il a été montré dans de précédentes études que les gènes IGHV4-59/61 étaient également très largement utilisés dans le répertoire des IGHV des sujets âgés et sains. Ceci pourrait suggérer que la présence de ces petits clones B serait liée au phénomène physiologique d'immunosénescence et/ou de stimulation antigénique chronique, conduisant à une restriction du répertoire lymphocytaire B, comme ce qui est observé chez des sujets sains avec l'âge. [48,54,55]

A l'inverse, les MBL cliniques présentent un répertoire proche des LLC mutées où les gènes IGHV3-07, IGHV3-23 et IGHV4-34 sont majoritairement utilisés. [56]

## 5. Evolution

Par analogie avec les MGUS vis-à-vis du myélome, la question essentielle est de déterminer si les MBL constituent des états « pré-LLC » et si oui dans quelles proportions. Les études de cohorte semblent montrer que la transformation d'une MBL en LLC reste relativement rare mais surtout que ce risque est bien différent entre les MBL de screening et les MBL cliniques.

### a. MBL de screening

Bien que beaucoup plus fréquentes, les MBL de screening n'ont fait l'objet que de peu d'études sur une longue période de suivi.

Sur 76 MBL de screening, le clone B de 90% des MBL LLC-like était toujours présent après un suivi de 3 ans et aucun d'entre eux n'avait progressé ni entraîné de signes cliniques en faveur d'une LLC [50].

Alors que le clone B est transitoire dans 10% des MBL LLC-like, cette fréquence semble bien plus élevée dans les MBL atypiques et non-LLC : 44.4% et 66.7% respectivement [50]. En revanche, l'étude de Nieto et al. ne met en évidence aucun clone transitoire dans une cohorte de MBL atypiques et non-LLC, mais avec la réserve toutefois que le suivi était ici limité à un an seulement. [57]

Ainsi, bien que possédant les mêmes anomalies cytogénétiques que la LLC, les MBL de screening persistent sans aucune évolution et la progression vers une LLC semble donc exceptionnelle dans cette entité. Des études avec davantage de recul sont néanmoins nécessaires afin de confirmer ces premières données.

Au final, plusieurs arguments ne sont pas en faveur du caractère « pré-leucémique » des clones B des MBL de screening : leur quasi-absence de progression, la moindre fréquence des anomalies cytogénétiques typiques de la LLC et l'utilisation d'un répertoire des IGHV différent de celui des LLC.

#### b. MBL cliniques

En ce qui concerne les MBL cliniques, la série de Rawstron et al. a suivi 185 patients atteints de MBL LLC-like pendant 6.7 ans. L'hyperlymphocytose a progressé pour 51 d'entre eux (28%), 28 ont développé une LLC (15%) et 13 (7%) ont nécessité une chimiothérapie. 62 décès (34%) sont survenus mais seuls 4 (2%) ont pu être imputés à la LLC. Parmi les MBL cliniques, le risque annuel de développement d'une LLC nécessitant un traitement a donc été évalué à 1.1%/an. De plus, les courbes de Kaplan-Meier de progression ne montrent pas de plateau, ce qui suggère qu'il n'y a pas de stabilisation du risque d'évolution au cours du temps et que la surveillance régulière de ces patients est nécessaire [51].

Néanmoins, ces études montrent que MBL ne signifie pas obligatoirement « syndrome lymphoprolifératif » car seulement environ 1% des MBL cliniques évolue chaque année en LLC symptomatique. Il est à noter que ce taux est similaire au risque de progression d'une MGUS vers un myélome [28].

En revanche, l'inverse semble vrai : la LLC provient quasi-systématiquement d'une MBL, de la même manière qu'un myélome est précédé d'une MGUS. Dans une étude rétrospective américaine, la recherche d'un clone B a été effectuée sur des prélèvements antérieurs au diagnostic de 45 patients atteints de LLC. 44 d'entre eux (98%) présentaient déjà un clone, ceci jusqu'à 77 mois auparavant [58].

### c. Transfusions sanguines et MBL

Les études de prévalence menées chez les donneurs de sang soulèvent le problème du risque de développement de lymphopathies B chez les receveurs à partir de donneurs ayant une MBL. Une méta-analyse conclut à une augmentation du risque de LNH, en particulier de LLC, chez les receveurs de transfusions sanguines [59]. Cependant aucun cas de MBL n'a été décrit à ce jour, probablement lié au fait que les concentrés de globules rouges sont déleucocytés [42].

En revanche, le développement d'une LLC après une allogreffe de cellules souches à partir d'un donneur possédant une MBL a été rapporté [60].

## 6. Facteurs pronostiques

Le risque de transformation des MBL en LLC, bien que faible, reste une réalité pour les MBL cliniques essentiellement. Dans la LLC, certains facteurs sont considérés comme de mauvais pronostic : l'expression du CD38, l'expression de ZAP-70 (Zêta Associated Protein-70), l'absence de mutations dans les gènes des IGHV et la présence d'anomalies cytogénétiques comme la délétion 17p, la délétion 11q et la trisomie 12.

Peu d'études ont analysé ces marqueurs dans les MBL, et aucun consensus n'a pour l'instant émergé, principalement du fait d'un faible nombre de patients inclus.

Les MBL CD38+ semblent associées à une mise sous traitement plus précoce selon Shanafelt et al. et selon Rossi et al. [56,61], alors que l'expression du CD38 n'est pas associée à la progression de la maladie selon Rawstron et al. [51]

De plus, l'expression de ZAP-70, un statut non muté des gènes des IGHV et la présence des anomalies cytogénétiques précitées semblent en faveur d'une survie sans traitement plus courte d'après Rossi et al., ce qui n'est pas confirmé par l'équipe de Shanafelt et al. [56,61]

Le seul facteur reconnu par l'ensemble des études comme facteur pronostique de survie globale et de survie sans traitement est la lymphocytose B, bien plus que le nombre de cellules clonales B [51,56]. Certains auteurs proposent même un seuil diagnostique entre

MBL et LLC plus élevé : une lymphocytose B à 11 G/L serait un meilleur facteur prédictif de survie. [62]

D'autres études à plus grande échelle sont donc nécessaires afin de confirmer ces résultats et, à l'heure actuelle, il n'est pas recommandé d'étudier l'ensemble de ces paramètres lors du diagnostic de MBL.

## 7. Surveillance

Il n'y a aucune indication à réaliser un immunophénotypage à la recherche d'une MBL chez un patient n'ayant aucun signe clinique et dont les paramètres hématologiques sont normaux, ni même chez un patient dont la famille est prédisposée à la LLC. Ce n'est qu'en présence d'une discrète hyperlymphocytose persistante que l'immunophénotypage est recommandé.

En cas de mise en évidence d'une MBL clinique, c'est-à-dire diagnostiquée sur une hyperlymphocytose, et compte-tenu du faible risque de progression et de la prévalence de cette anomalie, une simple surveillance annuelle est conseillée. Une consultation spécialisée en hématologie est nécessaire en cas d'apparition d'un syndrome tumoral, de symptômes B, d'une anémie, d'une thrombopénie, ou d'un temps de doublement des lymphocytes inférieur à un an [43,63].

A l'inverse, les MBL de screening dépistées lors d'examens systématiques ne nécessitent pas d'être surveillées et seraient source d'inquiétudes inutiles pour le patient.

### III. Mutations de MYD88 et LNH B

#### A. Immunité innée et TLR

##### 1. Structure et ligands des récepteurs Toll

Les progrès dans la compréhension de l'immunologie ont surtout porté sur l'immunité adaptative, en particulier sur les mécanismes de présentation de l'antigène et de mise en place de la réponse spécifique. Néanmoins, celui-ci ne peut combattre effectivement l'antigène que quelques jours après son entrée dans l'organisme, et l'activation immédiate d'une première ligne de défense, l'immunité innée, est indispensable.

Cette réponse n'étant pas spécifique, non dirigée contre un épitope particulier de l'antigène, cela suggère qu'elle est dirigée contre des motifs antigéniques communs à de nombreux pathogènes, conservés au sein des différents micro-organismes et absents chez les cellules de l'hôte : les PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern). Ces PAMP peuvent être les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif, les peptidoglycanes des bactéries à Gram positif, la flagelline, l'ADN de certains virus... [64] Il en découle que leurs récepteurs doivent être capables de reconnaître l'ensemble de ces PAMP. Ils ont été identifiés pour la première fois en 1996 chez la drosophile par Jules Hoffmann (prix Nobel de médecine en 2011) : ce sont les récepteurs Toll.

Par analogie avec les récepteurs Toll de la drosophile, les TLR (Toll-like Receptors) ont ensuite été découverts chez l'Homme et les autres mammifères. Ces récepteurs sont surtout situés sur les cellules folliculaires dendritiques et les macrophages. Ils sont au nombre de 10 chez l'Homme et présentent une structure proche de celle des récepteurs à l'interleukine 1 (IL-1R). [64]

En effet, ils sont composés d'un domaine intracytoplasmique de 150 à 200 acides aminés environ et qui est commun avec celui des IL-1R : le domaine TIR (Toll/IL-1R/R).

Le domaine transmembranaire est quant à lui riche en cystéine.

La partie extramembranaire diffère en revanche, elle comporte des domaines riches en leucines (les LRR, régions riches en leucine) alors que celle des IL-1R possède trois domaines immunoglobulines (figure 21). [64]

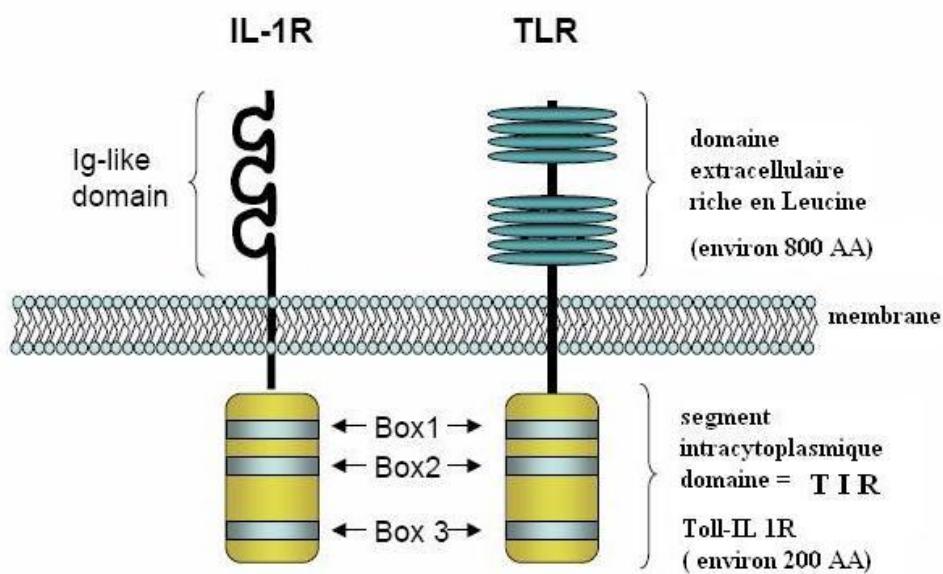
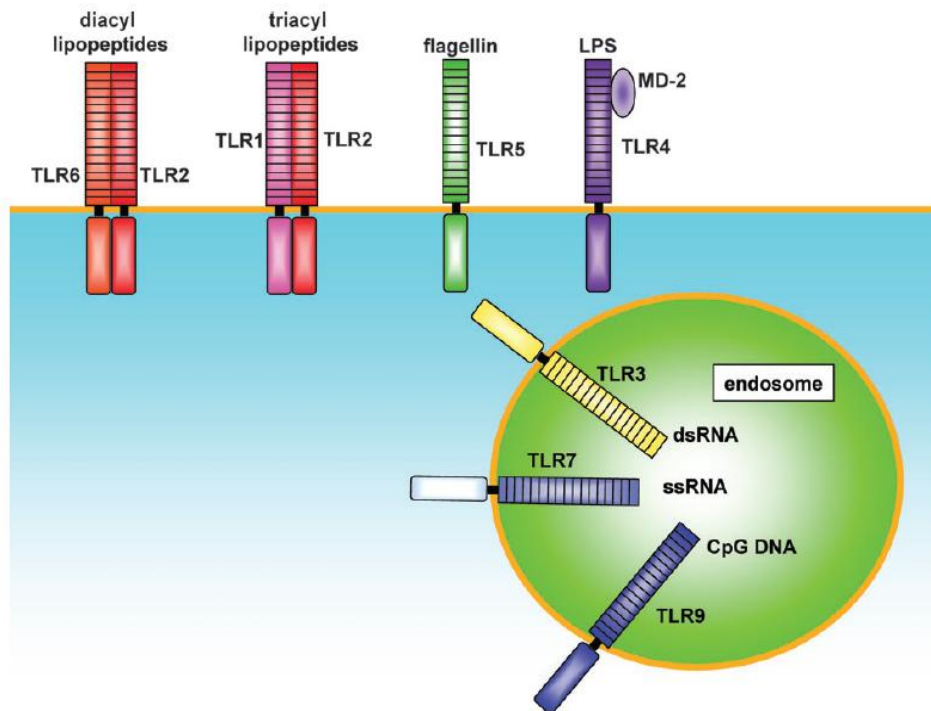


Figure 21 : Structures des TLR et IL-1R [65]

Ces TLR se spécialisent dans la reconnaissance de certains PAMP et selon l'origine de leurs ligands microbiens peuvent être exprimés en surface ou en intracellulaire. Par exemple, les TLR1, 2, 4, 5, 6 sont situés au niveau de la membrane cytoplasmique et reconnaissent des antigènes exogènes protéiques ou lipidiques, les TLR1, 2 et 6 reconnaissent les lipopeptides bactériens et peuvent s'associer en hétérodimères ou hétérotrimères, et le TLR5 reconnaît la flagelline...

En revanche, les TLR3, 7, 8, 9 sont spécialisés dans la détection des virus car ils reconnaissent les acides nucléiques endogènes. Ils sont situés au niveau de la membrane endosomale ou lysosomale, l'extrémité LRR étant intra-endosomale. Ces acides nucléiques peuvent notamment être de l'ARN double brin (TLR3), simple brin (TLR7 et 8) ou de l'ADN hypométhylé (TLR9) (figure 22). [66]



**Figure 22 : Les différents TLR et leurs ligands (LPS : lipopolysaccharides, dsRNA : ARN double brin, ssRNA : ARN simple brin, CpG DNA : ADN hypométhylé) [66]**

## 2. Voies de signalisation activées par les TLR

Mis à part le TLR2 qui s'hétérodimérise avec les TLR1 et TLR6, la reconnaissance des ligands par les TLR entraîne leur homodimérisation.

L'activation d'un TLR entraîne le recrutement de nombreuses kinases, aboutissant au sein du noyau à l'activation de facteurs de transcription permettant la synthèse des molécules de l'inflammation et de la réponse adaptative.

Après la liaison d'un ligand au niveau de la région riche en leucines d'un TLR, le domaine TIR intracytoplasmique du TLR interagit avec le domaine TIR de la protéine MYD88 (Myeloid Differentiation primary response 88). MYD88 est une protéine adaptatrice qui joue un rôle essentiel dans la voie de signalisation des TLR. Elle contient elle-même un domaine TIR à l'extrémité C-terminale et un domaine de mort (ou domaine DD, death domain) en N-terminal.

Puis, par l'intermédiaire de son domaine DD, MYD88 se lie aux sérine-thréonine kinases de la famille IRAK (en particulier IRAK1 et IRAK4) qui possèdent également un domaine DD. Dans le cas des TLR1, 2, 6 ou 4, l'activation de MYD88 se fait grâce au



cofacteur TIRAP, qui porte un domaine TIR. TLR7 et 9 n'ont en revanche pas de cofacteur de MYD88.

Pour TLR3 et TLR4, il existe une seconde voie de signalisation partiellement indépendante de MYD88. En effet, ces deux TLR peuvent également activer une autre protéine contenant un domaine TIR : TRIF (ou TICAM-1). Pour TLR4, TRIF est elle-même activée grâce à un cofacteur à domaine TIR, TRAM, ce qui n'est pas le cas pour TLR3 où TRIF ne nécessite pas de cofacteur. [64,66]

Ensuite, IRAK4 s'autophosphoryle, ce qui lui permet de s'associer à la protéine TRAF6, qui, après polyubiquitination lui permet d'activer TAK1, une autre sérine-thréonine kinase. TAK1 phosphoryle alors à son tour les kinases IKK $\beta$  et MKK6, elles-mêmes associées aux kinases IKK $\gamma$ /NEMO et IKK $\alpha$  contenues dans le complexe protéique.

Enfin, IKK $\beta$  phosphoryle l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, permettant ainsi à NF- $\kappa$ B d'être libéré pour être adressé directement dans le noyau. NF- $\kappa$ B a un effet direct sur la transcription des gènes codant les cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-18...) permettant le recrutement de nouveaux macrophages et cellules dendritiques et amplifiant ainsi la réponse innée. De plus, il favorise également la mise en place de la réponse spécifique en permettant la synthèse de costimulateurs dont le CD40, le CD80 et le CD86.

En ce qui concerne TLR3 et TLR4, une succession de phosphorylations impliquant d'autres kinases de la même famille qu'IKK $\beta$  (IKK $\epsilon$  et TBK-1) se succèdent et c'est la translocation du facteur de transcription IRF3 dans le noyau qui permettra notamment la synthèse d'IFN- $\beta$ . [64,66]

De plus, du fait de leur localisation à la surface des endosomes, les TLR3, 7 et 9 sont spécialisés dans la reconnaissance des virus et déclenchent préférentiellement la synthèse d'IFN- $\gamma$ , la principale cytokine antivirale.

L'ensemble de ces étapes est résumé dans la figure 23.

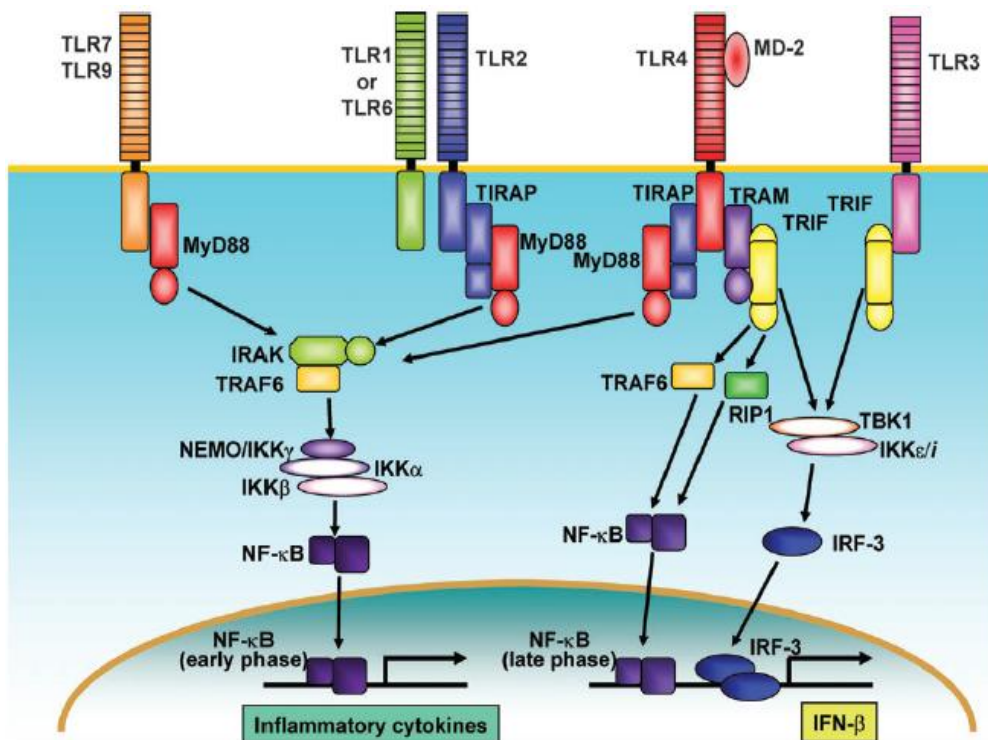


Figure 23 : Voies de signalisation des TLR [66]

De rares déficits de MYD88 consécutifs à des mutations autosomiques récessives ont été décrits chez des enfants se présentant avec des infections à bactéries pyogènes récurrentes (en particulier *Streptococcus pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*). Ce déficit de l'immunité innée est désormais compris grâce à la connaissance de la nature des ligands des TLR et de leurs voies de signalisation. [67]

## B. Implications de la mutation L265P de MYD88 dans les LNH B

### 1. Lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL)

Au sein des DLBCL, trois sous-types peuvent être distingués : les DLBCL de type ABC (Activated B-Cell like), GCB (Germinal Center-B-cell like) et PMBL (Lymphome B Primitif du Médiastin).

Il a été montré que les mutations des gènes TNFAIP3 (ou A20), CARD11 et CD79B provoquent une activation chronique et constitutive de la voie NF-κB dans les DLBCL de type ABC. [68]

En 2011, Ngo et al. [69] décrivent pour la première fois la fréquence élevée de la mutation L265P de MYD88 dans les DLBCL de type ABC. En effet, leur étude montre que 29% (45/155) des sujets atteints de DLBCL de type ABC présentent cette mutation, le plus souvent présente à l'état hétérozygote. En revanche, cette mutation est rare ou absente dans les DLBCL de type GCB et PMBL ainsi que dans le lymphome de Burkitt.

Cette mutation somatique survient sur l'exon 5 du gène MYD88 porté par le bras court du chromosome 3, une région pourtant conservée avec l'évolution. La mutation c.794T>C consiste en une substitution d'une thymine par une cytosine aboutissant au remplacement d'une leucine par une proline en position 265 de la séquence protéique de MYD88. Ceci provoque un changement de la structure tridimensionnelle de la protéine au niveau du domaine TIR et semble permettre à MYD88 de former un complexe avec IRAK1 et IRAK4 activant de manière constitutive la voie NF- $\kappa$ B et la survie des cellules tumorales [69]. De plus, les auteurs montrent que :

- Cette mutation présente un gain de fonction et confère un avantage sélectif aux cellules tumorales du DLBCL comparé aux cellules non mutées, suggérant un rôle majeur dans la lymphomagenèse.
- D'autres mutations de MYD88 ont été mises en évidence à une fréquence beaucoup plus faible que L265P, aussi bien dans les DLBCL de type ABC (8%) que dans les autres sous-types. Elles touchent le plus souvent le domaine TIR (mutations S222R, S243N, M232T...) et rarement le domaine de mort (V52M notamment).

En 2013, l'étude quantitative de l'expression de la protéine MYD88 intracytoplasmique a également été réalisée conjointement à la recherche de la mutation L265P dans un groupe de 124 DLBCL. MYD88 était surexprimée dans 39% des cas (48/124) alors que la mutation était présente chez 6.5% (8/124) des patients. La surexpression était significativement associée à l'âge avancé, à des rechutes plus fréquentes et à une survie plus courte mais n'était pas associée à la présence de la mutation L265P de MYD88. [70]

De plus, la mutation L265P de MYD88 a depuis été retrouvée dans 36% des DLBCL du système nerveux central et 69% des DLBCL primitivement cutanés de la jambe dans de petites séries. [71,72]

## 2. Leucémie lymphoïde chronique (LLC)

Le séquençage du génome des patients atteints de LLC a également permis de mettre en évidence la mutation L265P de MYD88 dans cette pathologie. Puente et al. [73] identifient cette mutation dans 2.9% des cas (9/310). De son côté, l'étude de Wang et al. [74] mettent en évidence trois mutations différentes (L265P et M232T déjà décrites dans les DLBCL, et P258L non connue) représentant 10% des cas (9/91), mais la fréquence de la mutation L265P elle-même n'est malheureusement pas précisée.

De plus, les patients porteurs de cette mutation étaient plus jeunes et à un stade plus avancé de la LLC que les patients non mutés pour MYD88, cependant sans conséquence en termes de survie ou de progression. [73]

La présence de cette mutation était également significativement associée au statut muté des IGHV et tous les patients présentant une mutation de MYD88 étaient également porteurs d'une délétion 13q. [74]

## 3. Lymphomes de la zone marginale (MZL)

La mutation L265P MYD88 a également été recherchée dans des séries de patients atteints de lymphome de la zone marginale splénique. Elle a été détectée dans 13% des cas selon Yan et al. [75], 21% selon Jimenez et al. [76], 10% selon Xu et al. [77], 7% selon Treon et al. [78] et 6% selon Varettoni et al. [79]

En ce qui concerne les lymphomes de la zone marginale ganglionnaire, il n'y a aucun patient muté MYD88 L265P dans la série de Gachard et al. [33]

En revanche, dans les lymphomes du MALT, Ngo et al. montrent que 9% des patients de leur série sont porteurs de cette mutation. [69]

## 4. MGUS et maladie de Waldenström/lymphome lymphoplasmocytaire

Les MGUS à IgM ont un risque de transformation en maladie de Waldenström ou en un autre lymphome B estimé à 1.5% par an environ. [80] Néanmoins, les événements génétiques responsables de cette progression ne sont pas connus.

L'équipe de Treon et al. [78] a séquencé par la méthode de Sanger la région contenant le gène MYD88 à partir de moelles osseuses de patients atteints de lymphome

lymphoplasmocytaire, de MGUS à IgM et d'autres LNH B. Au total, la mutation L265P s'est révélée présente dans 91% des cas de maladie de Waldenström (49/54) et dans 3 cas sur 3 de LPL non-sécrétant d'IgM (IgG et IgA).

En revanche, cette mutation n'a été retrouvée que dans 10% (2/21) des MGUS à IgM et dans 7% des ZML (3/46) d'autant que ceux-ci présentaient de nombreuses caractéristiques de la MW dont la présence d'une IgM monoclonale.

De plus, la mutation était absente chez tous les patients sains qui servaient de témoins négatifs et dans tous les cas de myélomes y compris dans les deux cas de myélome à IgM.

Ces premiers résultats très prometteurs ont successivement été vérifiés par plusieurs études en développant une technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) allèle-spécifique plus sensible. Varettoni et al. [79] et Xu et al. [77] confirment l'importance de cette mutation dans la MW puisque respectivement 100% et 93% des cas de MW sont porteurs de la mutation.

En revanche, seuls 6% des SMZL et 6% des autres syndromes lymphoprolifératifs B (SLP B) étaient mutés MYD88, d'autant que 4 des 5 SMZL et les 3 SLP B possédaient une IgM monoclonale. [79]

L'ensemble des résultats de ces études suggère que la mise en évidence de la mutation L265P MYD88 pourrait devenir un nouvel outil diagnostique permettant de différencier dans la majorité des cas de LPL des autres LNH B dont le diagnostic différentiel est difficile, en particulier les SMZL.

En ce qui concerne les MGUS à IgM, les études montrent une fréquence supérieure à celle de Treon et al., 47% et 54% selon Varettoni et al. et Xu et al. respectivement, ce qui pourrait être expliqué par une plus grande sensibilité de la PCR utilisée. [77,79]

La présence de cette mutation dans environ la moitié des cas de MGUS à IgM suggère qu'elle pourrait être un évènement génétique survenant précocement dans le développement de la MW et conférant alors un avantage sélectif au clone (mutation « driver »).

De plus, Varettoni et al. ont également montré dans deux séries que le risque d'évolution en MW ou en SLP B des patients présentant une MGUS à IgM et porteurs de la mutation L265P de MYD88 était significativement supérieur à celui des patients MYD88 porteurs de l'allèle sauvage. Ainsi la présence de cette mutation dans les MGUS à IgM pourrait devenir un nouveau marqueur pronostic du risque de progression. [79,81]

Les résultats des principales études de la mutation L265P de MYD88 dans les LNH sont résumés dans l'annexe 3.

Ils ouvrent également de nouvelles perspectives puisque l'inhibition de MYD88 et donc de la voie NF- $\kappa$ B représentent une cible potentielle majeure en thérapeutique afin de développer de nouveaux traitements de la maladie de Waldenström.

#### IV. Principes généraux de biologie moléculaire : la PCR et le séquençage

Les études de biologie moléculaire sont désormais devenues incontournables en hématologie biologique pour le diagnostic et/ou le suivi de la plupart des hémopathies, qu'elles soient lymphoïdes ou myéloïdes, aiguës ou chroniques. Leur utilisation dans le cadre des LNH B est systématique et indispensable, en association avec la cytologie (sanguine et/ou médullaire et/ou ganglionnaire), la cytométrie en flux et la cytogénétique.

Deux de ces techniques utilisées en routine sont la PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) et le séquençage. Mais auparavant il est nécessaire d'extraire et de purifier l'ADN à analyser.

##### A. Etape d'extraction de l'ADN

L'étape d'extraction consiste à isoler l'ADN des cellules ou des tissus, le purifier et le concentrer. L'ADN ainsi extrait peut être utilisé pour des analyses de biologie moléculaire, comme par exemple la PCR, le séquençage, le clonage... Qu'elle soit manuelle ou automatique, l'extraction de l'ADN repose sur un principe général commun. Il faut ainsi procéder à :

- à une lyse des cellules,
- à l'élimination du matériel (protéines, lipides, polysaccharides...) pouvant inhiber la réaction
- à la purification de l'ADN
- et à la concentration de l'ADN

##### 1. Extraction manuelle

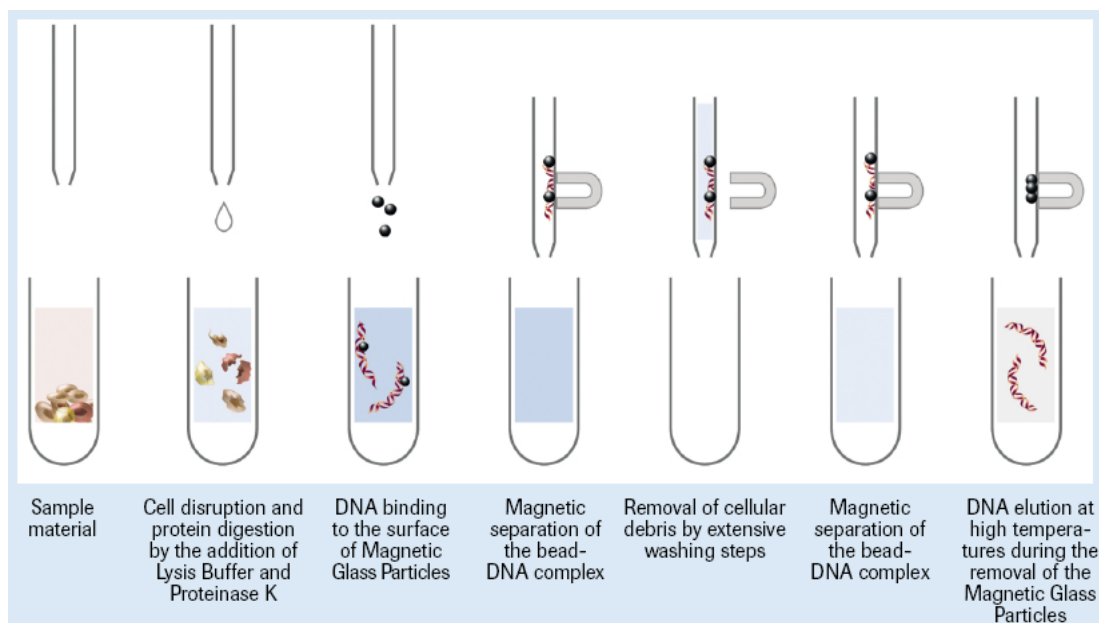
C'est la méthode de référence. Elle utilise l'extraction par le couple phénol-chloroforme. Lorsque l'échantillon biologique est du sang total, il faut tout d'abord procéder à une étape de lyse osmotique des globules rouges afin de récupérer les globules blancs. Puis, l'utilisation d'un détergent tel que le dodécylsulfate de sodium (SDS) et d'une protéinase, la protéinase K, permettent respectivement de rompre les membranes cellulaires et de détruire les protéines associées à l'ADN. Ensuite, le phénol va permettre de séparer efficacement les protéines résiduelles des acides nucléiques grâce à son action dénaturante. Il sera éliminé par

le chloroforme. Après centrifugation, la phase organique et la phase aqueuse se séparent, cette dernière contenant les acides nucléiques. Enfin, une étape de précipitation par l'alcool permet d'obtenir les acides nucléiques sous forme solide. [82]

## 2. Extraction automatique

L'intérêt des extracteurs automatiques est double car l'automatisation permet d'obtenir à la fois un gain de temps et une reproductibilité optimale.

Par exemple, dans le cas de l'extracteur automatique MagNA Pure<sup>®</sup> de Roche<sup>®</sup>, après une première étape de lyse des cellules et de digestion des protéines, l'ADN est fixé à des billes magnétiques permettant d'éliminer les débris cellulaires. Puis l'ADN est élué de ces billes à haute température (figure 24). [83]



**Figure 24 : Principe de l'extraction automatique par le MagNA Pure<sup>®</sup> Compact [83]**

### B. Principes de la PCR conventionnelle

La réaction de PCR est une technique de biologie moléculaire permettant d'obtenir d'importantes quantités d'une séquence d'ADN spécifique. Cette méthode d'amplification des séquences nucléiques a été décrite pour la première fois par Kary Mullis en 1983 et lui valut le prix Nobel de chimie en 1993. Ses applications sont multiples, notamment en microbiologie, hématologie et génétique.



Son principe consiste à recopier puis amplifier un segment d'ADN grâce à une enzyme, l'ADN polymérase (ou Taq polymérase). Cette enzyme thermorésistante est capable de synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Il existe deux types de PCR : la PCR conventionnelle et la PCR en temps réel.

La PCR permet de cibler et d'amplifier un segment d'ADN particulier dans le génome. Elle consiste à réaliser une succession de réactions de réplication, appelées cycles, à partir d'une matrice d'ADN double brin. Chaque réaction utilise deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou « primers » en anglais définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier.

Avant la réaction, tous les acteurs de la PCR doivent être présents : l'ADN à amplifier, les amorces pour cibler le segment d'ADN voulu, l'enzyme permettant la réplication du brin d'ADN (la Taq polymérase) et les 4 déoxyribonucléotides (dNTP) constitutifs de l'ADN (désoxycytidine triphosphate (dCTP), désoxyguanosine triphosphate (dGTP), désoxyadénosine triphosphate (dATP) et désoxythymidine triphosphate (dTTP)). Le mélange ainsi réalisé est appelé « mix ». [82]

La PCR est réalisée dans un thermocycleur (ou bloc thermique) dans lequel les tubes contenant le mix de PCR sont insérés. Il a pour fonction d'amener l'échantillon aux températures voulues pendant une durée programmée en effectuant des cycles.

Chaque cycle est divisé en 3 phases : dénaturation, hybridation et élongation. A chaque phase correspond une température définie (figures 25 et 26) :

- la dénaturation consiste à rompre les liaisons faibles de la double hélice d'ADN pour donner 2 simples brins d'ADN. La température est en général de 95°C.
- l'hybridation repose sur le principe de l'appariement des amorces à la séquence d'ADN complémentaire. La température est inférieure à celle de la dénaturation et dépend des amorces choisies. En effet, chaque amorce a une température de fusion propre appelée  $T_m$  qui correspond à la température où 50% de l'ADN est simple brin.
- l'élongation correspond à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice par la Taq polymérase. Elle se fait par ajouts successifs de dNTP à la température d'environ 72°C.

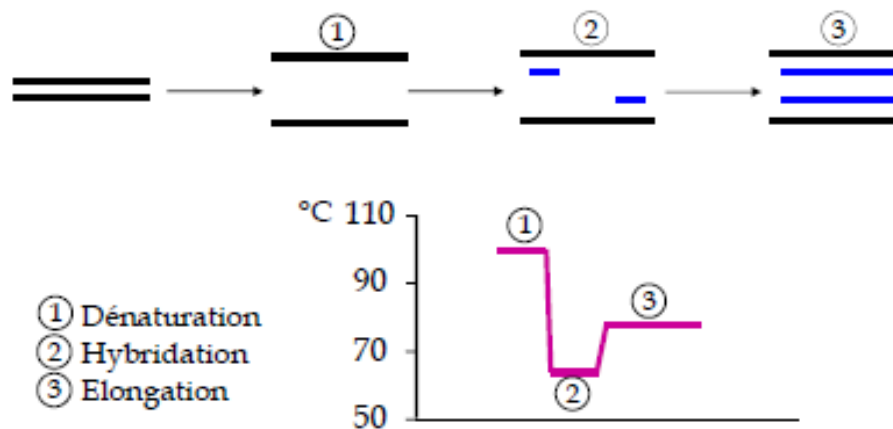


Figure 25 : Etapes de la réaction de PCR [82]

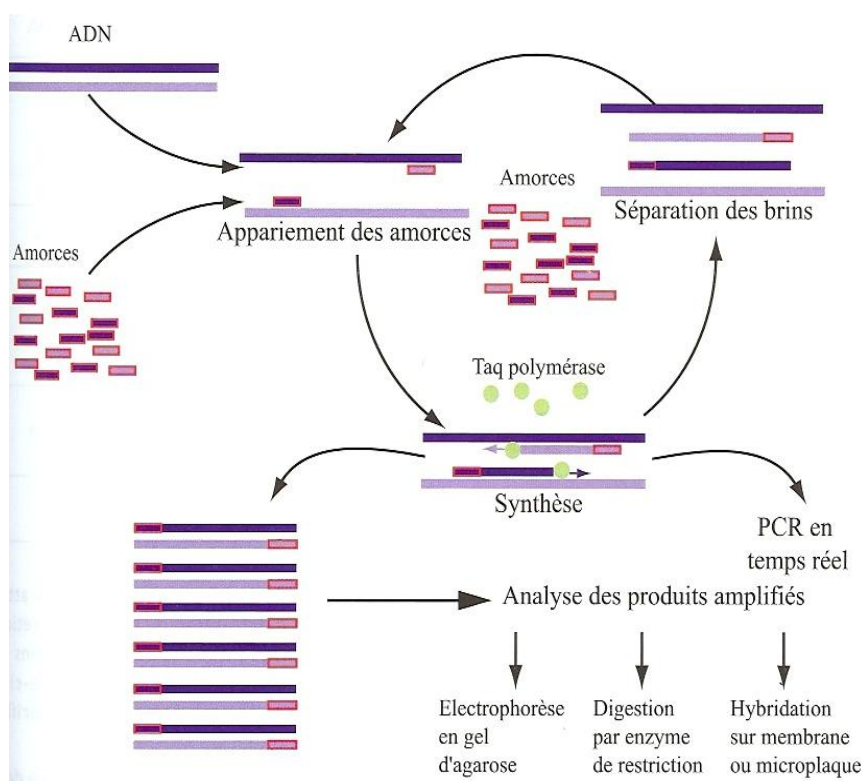


Figure 26 : Principe de la technique d'amplification en chaîne par polymérase ou PCR [82]

Ainsi chaque brin d'ADN nouvellement formé sert à son tour de matrice pour un nouveau cycle : la quantité d'ADN formée est donc exponentielle et au bout de  $n$  cycles on obtient  $2^n$  brins d'ADN.

Les produits d'amplification sont ensuite déposés sur un gel d'électrophorèse contenant un agent intercalant de l'ADN, le bromure d'éthidium (BET), et soumis à un champ électrique constant. Afin de déterminer le poids moléculaire des amplicons, un marqueur de poids moléculaire connu est déposé. La séparation des fragments d'ADN se fait selon le poids

moléculaire de l'ADN. Les acides nucléiques sont rendus fluorescents grâce au bromure d'éthidium lorsque le gel est analysé sous une lampe à UV.

Le risque majeur de cette technique est la contamination des produits amplifiés lors de la manipulation.

### C. Principes du séquençage selon la méthode de Sanger

Le séquençage consiste à déterminer l'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN ou, de façon plus générale, d'un génome. Son histoire débute en 1977 lorsque Maxam et Gilbert développent une technique basée sur le marquage radioactif de fragments et leur coupure sélective par dégradation chimique. En parallèle, Sanger développe une technique basée sur une synthèse enzymatique des fragments d'ADN après leur amplification par clonage. En 1980, Sanger et Gilbert partageront le prix Nobel de chimie pour leurs découvertes respectives. Depuis une trentaine d'années, l'amélioration technique de l'amplification, l'utilisation de marqueurs fluorescents et l'apparition d'automates dédiés au séquençage ont permis d'améliorer considérablement les techniques de séquençage.

Cette technique utilise la propriété qu'ont les ADN polymérases de synthétiser un brin complémentaire d'un brin matrice en présence de nucléotides adaptés. Ces derniers contiennent, en plus des quatre désoxyribonucléotides standards (dNTP), une faible concentration de didésoxyribonucléotides (ddNTP). Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. Cette modification empêche l'incorporation du nucléotide suivant en bloquant la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter un nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête et l'allongement de la chaîne est interrompu. Cette incorporation de ddNTP se faisant de façon aléatoire, on obtiendra donc au final de multiples brins d'ADN de tailles différentes (figure 27). [84]

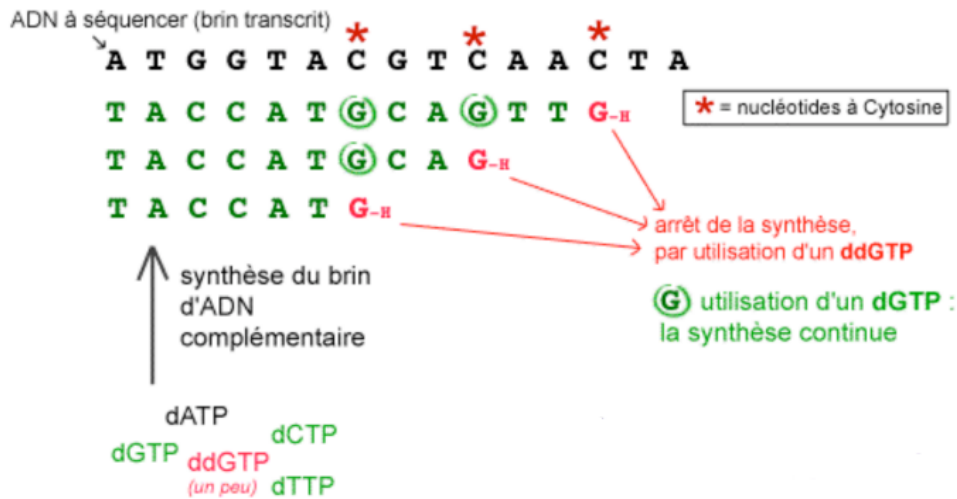


Figure 27 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger, exemple avec le ddGTP [84]

Dans le cas d'un séquençage manuel, on procède ensuite à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide du produit de cette réaction afin de séparer tous les fragments présents en fonction de leur taille. Chacun des ddNTP (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) étant marqué par un fluorochrome dont le spectre d'émission est spécifique, on pourra ainsi identifier le ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment et donc déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice initial. Néanmoins, la technique est longue et la séquence nucléotidique lue limitée à 300 nucléotides environ. [84]

Désormais, la grande majorité des séquençages se font par des séquenceurs automatiques capables de réaliser les réactions et de lire les séquences. Ils détectent la fluorescence à la sortie des colonnes de chromatographie et déterminent ainsi la taille des fragments d'ADN. Les résultats sont rendus sous formes de chromatogrammes correspondant aux fluorescences détectées pour chacun des nucléotides ainsi que l'interprétation qui en est faite en termes de nucléotide (figure 28). Ils présentent de nombreux avantages : gain de temps, capacité de lire plusieurs centaines de nucléotides à la fois, coût de revient plus faible.

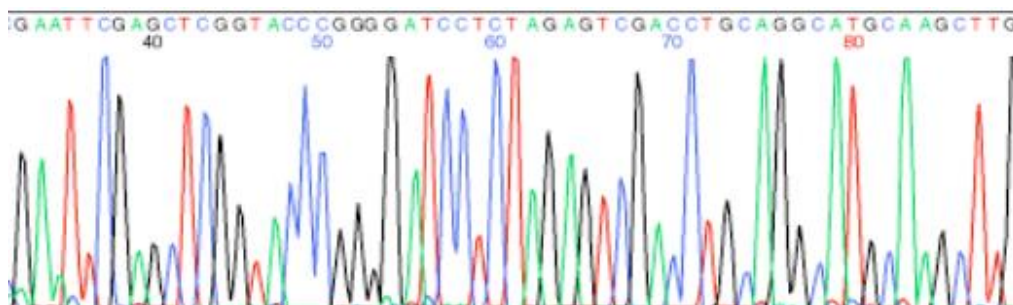


Figure 28 : Exemple de résultat de séquençage par un séquenceur automatique [84]

## Deuxième partie : Etude rétrospective de la mutation L265P de MYD88 et du suivi de 26 cas de lymphocytose B monoclonale au CHU de Limoges entre 2005 et 2012

---

### I. Matériels et méthodes

#### A. Sélection des données et des patients

Une base de résultats de cytométrie en flux contenant 9828 dossiers répartis sur presque 8 ans (93 mois) entre février 2005 et novembre 2012 a été recueillie rétrospectivement. Cette base initiale regroupe tous les immunophénotypages réalisés durant cette période au laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges et concerne donc aussi bien des immunophénotypages de pathologies lymphoïdes et myéloïdes, chroniques et aiguës, des diagnostics et des suivis, ainsi que des prélèvements d'origines différentes (sang, moelle, ganglion...). Comme indiqué dans l'annexe 4, différents critères de sélection biologiques (immunophénotypiques, cytologiques, anatomopathologiques, biochimiques) et cliniques ont donc été appliqués successivement à cette première base de cytométrie (n=9828) afin de constituer une base de données de patients atteints de lymphocytose B monoclonale atypique et non-LLC selon la définition de l'IWCLL. Lors de sa création, la base a été soumise à deux relectures par un second observateur afin d'affiner les critères de sélection et d'obtenir davantage de renseignements cliniques et biologiques.

Dans un premier temps, seuls les immunophénotypages sanguins révélant la présence d'un clone lymphocytaire B circulant dont le score de Matutes était strictement inférieur à 4 et dont la cytologie et l'immunophénotypage ne permettaient pas d'orienter le diagnostic vers un LNH particulier (notamment clone B CD10-, CD11c-, CD103-, CD123-, CD25-...) ont été conservés (n=204). Puis, afin d'exclure les patients atteints de lymphomes, tous ceux pour lesquels un examen anatomopathologique concluait à un LNH et/ou ceux dont la recherche d'une hyperexpression de la cycline D1 en biologie moléculaire était positive ont été éliminés (n=149). Nous justifions la conservation des patients pour lesquels ces deux examens n'ont pas été réalisés en émettant l'hypothèse que le contexte clinique était probablement peu évocateur d'un LNH et ne justifiait pas ces recherches.

Ensuite, toujours pour respecter la définition des MBL, les lymphocytoses B sanguines inférieures à 5 G/L ont été conservées (n=105).

Puis, seuls les patients ne présentant ni syndrome tumoral ganglionnaire (absence d'adénopathie) ou splénique (absence splénomégalie) à l'examen clinique ou repéré par un examen d'imagerie, ni symptômes B (sueurs nocturnes, amaigrissement...) ont été retenus (n=50).

Enfin, tous les patients ayant reçu un traitement spécifique contre ce clone B et/ou présentant un sepsis et/ou des cytopénies auto-immunes diagnostiquées par un test de Coombs positif et/ou dont le suivi clinique et biologique était inférieur à 6 mois ont été exclus.

Ainsi, au final, 26 patients atteints de lymphocytose B monoclonale ont pu être inclus. Ils se répartissent en deux sous-groupes : le groupe des MBL atypiques lorsque le CD5 est positif (n=8, patients n°1 à 8) et le groupe des MBL non-LLC lorsque le CD5 est négatif (n=18, patients n°9 à 26).

De plus, un groupe « contrôle » a été formé en parallèle (n=9). Ces patients ont été sélectionnés sur les mêmes critères que pour le groupe des MBL mais à la seule différence qu'ils présentaient un syndrome tumoral (ganglionnaire et/ou splénique) et/ou des symptômes B. Ce second groupe a été constitué non pas dans l'optique d'une étude de suivi mais dans le cadre de l'étude de la mutation L265P de MYD88. En effet, il s'agit de patients présentant un clone B circulant dont le score de Matutes est strictement inférieur à 4 et associé à un syndrome tumoral. Les caractéristiques clinico-biologiques de second groupe n'ont donc été recueillies qu'au moment du diagnostic.

Pour chacun des patients de ces trois groupes, les données étaient collectées grâce aux logiciels utilisés au CHU de Limoges : Glims<sup>®</sup> du système informatique du laboratoire et Crossway<sup>®</sup> pour la gestion des données patients. Néanmoins, certains paramètres n'ont pas pu être évalués à la fin du recueil par manque de données. C'est notamment le cas de la lymphocytose B où l'immunophénotypage n'était pas prescrit une seconde fois.

Les différentes données recueillies étaient :

- d'ordre démographique : sexe, âge au diagnostic et à la fin du recueil, service prescripteur, origine du prélèvement, durée de suivi (différence entre la date du dernier bilan et la date du diagnostic)

- d'ordre anatomopathologique : existence ou non d'une histologie (ganglionnaire, médullaire...)
- d'ordre clinique : présence ou non d'une évolution clinique jusqu'à la fin du recueil, présence ou non d'un syndrome tumoral (adénopathies, splénomégalie...) et de symptômes B.
- d'ordre biologique :
  - par un automate de numération-formule sanguine Siemens Advia 2120i<sup>®</sup>, au diagnostic et à la fin du recueil : hémoglobine, numération leucocytaire, numération plaquettaire, lymphocytose totale et taux d'accroissement des lymphocytes (différence entre la lymphocytose à la fin du suivi et au diagnostic rapportée à la durée du suivi)
  - cytologie lymphocytaire sanguine
  - cytologie médullaire lorsqu'un myélogramme a été réalisé
  - par biologie moléculaire : recherche d'hyperexpression de la cycline D1, recherche de mutations de Bcl2, de P53 et statut mutationnel du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGHV) si réalisés
  - caryotype (si réalisé)
  - en biochimie : électrophorèse (avec intégration du pic, au début et à la fin du recueil, si réalisée), immunofixation des protéines plasmatiques (si réalisée), ainsi que dosage des LDH, de la  $\beta$ 2m et des immunoglobulines de type IgG, IgA et IgM au diagnostic
  - test de Coombs
  - immunophénotypage lymphocytaire sanguin au diagnostic par des cytomètres Beckman Coulter<sup>®</sup> : un FC500<sup>®</sup> à 5 couleurs utilisé entre 2005 et 2010 et un Navios<sup>®</sup> à 10 couleurs en service depuis 2010. Tous les anticorps et fluorochromes utilisés ont été produits par la société Beckman Coulter<sup>®</sup> hormis les couples FMC7-FITC, kappa-FITC et lambda-PE fournis par Dako<sup>®</sup>. Les paramètres analysés sont :
    - la lymphocytose T CD3+, la lymphocytose T CD4+ CD8- et la lymphocytose T CD4- CD8+
    - la lymphocytose B CD19+
    - l'intensité des différents marqueurs utilisés dans le diagnostic des LNH B à partir de deux panels d'anticorps : le panel « orientation LNH B » puis le panel « complément B » (annexes

5 et 6). Ces marqueurs sont : CD5, CD23, CD22, CD79b, FMC7, immunoglobuline de surface, CD22, CD11c, CD103, CD10, CD25, CD43 et calcul du score de Matutes.

## B. Etudes de biologie moléculaire

La détection de la mutation c.794T>C, p.L265P dans le domaine TIR du gène MYD88 a été réalisée selon un protocole maison publié par Gachard et al. [33] à partir d'ADN génomique total de cellules congelées chez des patients pour lesquels d'autres examens de biologie moléculaire avaient été demandés au diagnostic (en particulier la recherche d'une hyperexpression de la cycline D1). Seule cette mutation a été recherchée dans cette étude. Pour cela, deux techniques ont été utilisées :

- la première, par PCR suivie d'une digestion pour les patients dont on disposait d'ADN (n=23)
- puis par séquençage pour les patients négatifs ou faiblement positifs en PCR (n=19)

### 1. Technique de PCR-digestion

La première étape consiste en une amplification de l'exon 5 (325 pb) du gène MYD88 sur l'ADN génomique total par une technique de PCR conventionnelle. Les amorces sens (MYD88-Ex5-F1) et antisens (MYD88-Ex5-R1) sont décrites dans le tableau 11. Puis, une étape de digestion de l'amplicon par l'enzyme de restriction BsiEI permet de couper l'ADN en deux fragments lorsqu'il porte une cytosine à la place d'une thymine en position c.794T>C. La sensibilité de la technique est estimée à 6%. [33]

MYD88-Ex5-F1	5'-CTTAGATGGGGGATGGCTGT-3'
MYD88-Ex5-R1	5'-AGGAGGCAGGGCAGAAGTA-3'

**Tableau 11 : Amorces utilisées pour l'amplification de l'exon 5 du gène MYD88**

#### a. Préparation du mix PCR

La préparation du mix PCR est réalisée en ajoutant pour chaque patient :

- Amorces sens MYD88-Ex5-F1 : 10 µM



- Amorce antisens MYD88-Ex5-R1 : 10  $\mu$ M
- Taq'Ozyme Purple Mix 2X (contient notamment les dNTP, la Taq Polymérase, le  $MgCl_2$  et un tampon pH (Tris HCl)) : 12.5  $\mu$ L
- ADN : 50 ng
- Eau distillée : quantité suffisante pour 25  $\mu$ L

Chaque série doit de plus contenir un témoin négatif dans lequel de l'eau distillée remplace l'ADN, et un témoin positif contenant de l'ADN de la lignée cellulaire OCi-LY3 homozygote pour la mutation L265P.

### b. Amplification

L'étape d'amplification de l'ADN est réalisée grâce à l'un des quatre thermocycleurs disponibles (GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 ou Arktik<sup>®</sup> Thermal Cycler) selon le tableau 12 ci-dessous.

Etapes	Température	Durée
Dénaturation initiale	95°C	3 min
Amplification : 35 cycles	95°C	30 s
	58°C	30 s
	72°C	35 s
Elongation finale	72°C	5 min

**Tableau 12 : Etape d'amplification sur les thermocycleurs**

### c. Digestion de l'amplicon

La digestion des produits de PCR par l'enzyme de restriction dure 2h à 60°C dans un des thermocycleurs. Le mix de digestion contient :

- l'endonucléase BsiEI : 4 U
- BSA 100X (albumine de sérum bovin) : 0.25  $\mu$ L
- Tampon 10X N°4 (contient un tampon pH (Tris HCl) et du  $MgCl_2$ ): 2.5  $\mu$ L
- Eau : 1.85  $\mu$ L
- Produit de PCR : 20  $\mu$ L

#### d. Migration

Elle a lieu sur un gel d'agarose à 2.4% imprégné de bromure d'éthidium (BET) sous un champ électrique de 100 V. Outre les produits de digestion de chacun des patients, on dépose également un marqueur de taille Kb Plus<sup>®</sup> ou Low Ladder<sup>®</sup>.

#### e. Interprétation

Plusieurs profils témoignant de la présence ou non de la mutation peuvent être observés. Ainsi, l'ADN d'un patient non muté qui porte une thymine sur chacun des deux allèles ne présentera qu'une seule bande d'ADN de 325 pb après migration puisque l'enzyme n'a pas pu couper l'ADN.

En revanche, chez un patient homozygote pour cette mutation (possédant donc une cytosine à la place d'une thymine sur chacun des 2 brins), l'enzyme coupera les deux brins d'ADN et on observera donc pour chacun d'eux une bande de 205 pb et une bande de 120 pb.

Si la mutation est hétérozygote, seul le brin muté sera coupé et on obtiendra ainsi trois bandes de 325, 205 et 120 pb (figure 29)

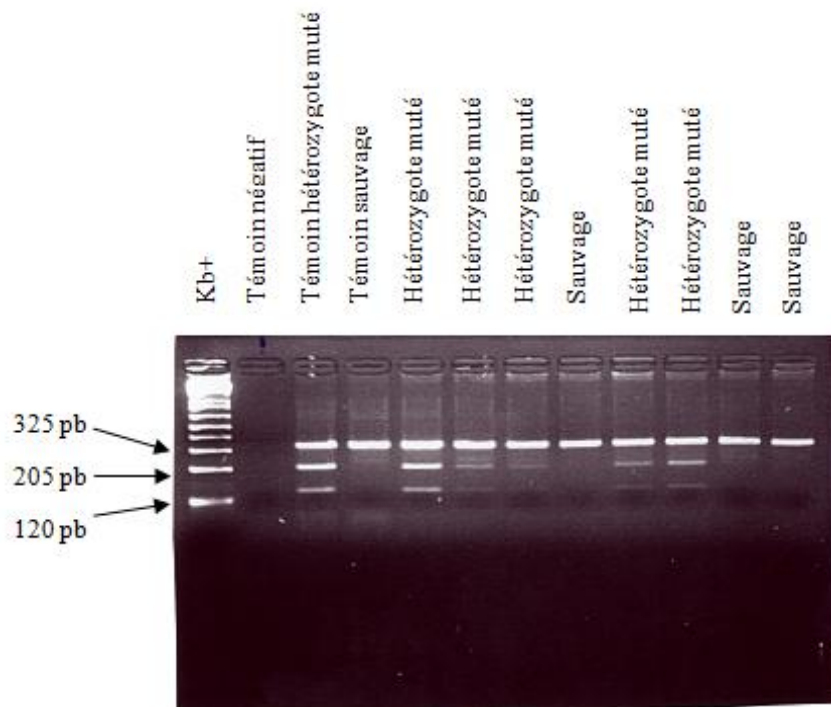


Figure 29 : Interprétations des profils obtenus après migration sur gel pour une série de patients

## 2. Technique de séquençage

Cette technique a été utilisée afin de contrôler les patients négatifs ou faiblement positifs en PCR-digestion selon la méthode décrite et employée par Gachard et al. [33] Sa sensibilité est estimée entre 10 et 20%.

### a. PCR initiale

Une première étape de PCR est toujours nécessaire afin d'amplifier le nombre de copies d'ADN. Il s'agit exactement du même protocole et de la même technique que celle décrite ci-dessus.

### b. Purification des produits de PCR

L'ADN amplifié est ensuite purifié sur des colonnes de silice par le kit NucleoSpin Gel and PCR Cleanup (Macherey-Nagel®) afin d'éliminer les amorces non incorporées et les réactifs de PCR précédents qui pourraient inhiber la réaction de séquençage.

### c. PCR de séquençage

Ici, on procède à deux réactions de séquençage, une pour chaque amorce. Les amorces sont celles utilisées dans la PCR initiale. Le mix PCR est composé pour chacun des deux tubes de :

- Amorce sens ou amorce antisens : 1  $\mu$ L
- Tampon 5X (contient notamment un tampon pH (Tris HCl) et le  $MgCl_2$ ) : 2.5  $\mu$ L
- BigDye® (contient notamment la Taq Polymérase, les dNTP et les ddNTP) : 3  $\mu$ L
- Eau : 8.5  $\mu$ L
- Produit de PCR : 5  $\mu$ L

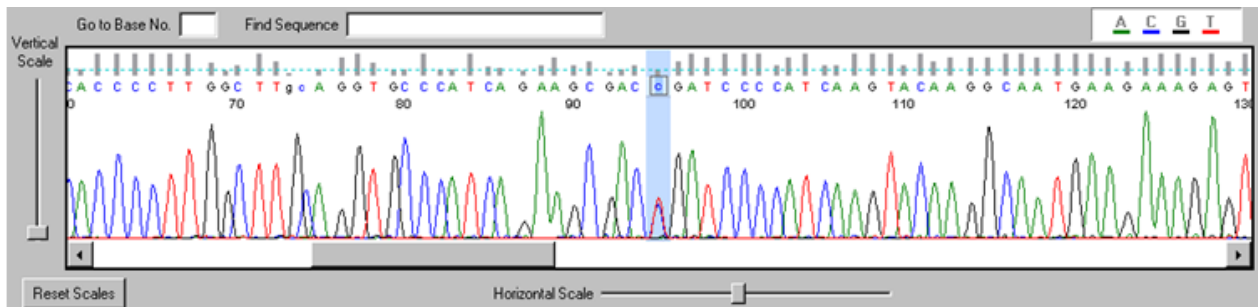
### d. Purification du produit de séquençage

Afin d'éliminer les ddNTP non incorporés, le produit de séquençage a été purifié par l'intermédiaire de colonnes de résine incluses dans le kit DyeEx Spin (Qiagen®).

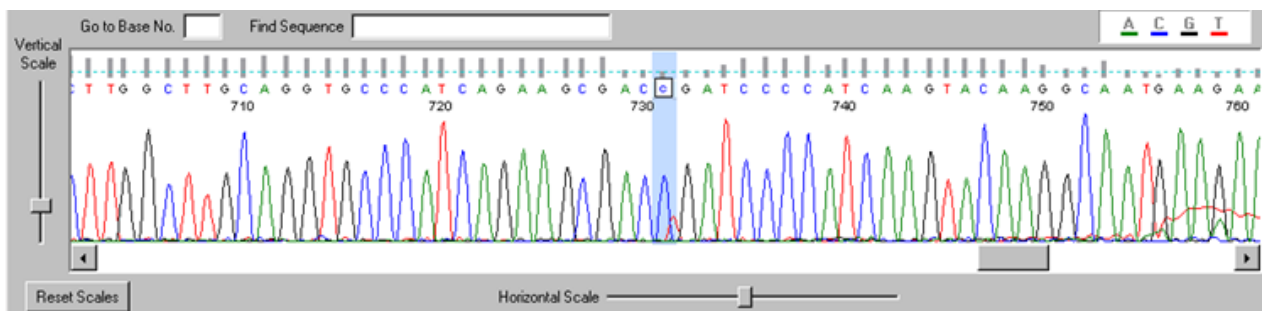
### e. Passage au séquenceur

L'analyse des séquences a été réalisée par le séquenceur automatique ABI Prism 3100 DNA (Life Technologies®) en capillaires et à l'aide du logiciel ABI Prism Sequencing Analysis 3.7.

Les figures 30 et 31 montrent un exemple de séquence obtenue avec les deux amorces chez un patient muté hétérozygote c.794T>C dans laquelle une thymine est remplacé par une cytosine.



**Figure 30 : Séquence d'un patient muté L265P avec l'amorce sens MYD88-Ex5-F1**



**Figure 31 : Séquence d'un patient muté L265P avec l'amorce antisens MYD88-Ex5-R1**

### C. Traitement statistique des données

Les résultats statistiques ont été calculés et obtenus selon les tests non-paramétriques suivants : test de Mann-Whitney ou de Wilcoxon dans le cas de variables continues indépendantes ou appariées respectivement, test de Fisher dans le cas de variables qualitatives sur de petits échantillons ( $n < 5$ ). La valeur de  $p \leq 0.05$  a été considérée comme associée à une différence statistiquement significative.

## II. Résultats

### A. Caractéristiques des MBL atypiques et non-LLC au diagnostic

Les caractéristiques démographiques et biologiques individuelles des 26 patients sont résumées dans l'annexe 7. Les caractéristiques globales initiales, au diagnostic, sont compilées dans les tableaux 13 et 14.

Au total, 26 patients ont été inclus dans cette étude, représentés par 14 hommes (54%) et 12 femmes (46%). L'âge médian est de 73.5 ans (50 à 89 ans). 65% (17/26) de ces patients ont consulté dans le service d'hématologie clinique, les autres étaient adressés par les services de médecine interne, gériatrie, cardiologie, etc... du CHU de Limoges.

Le groupe MBL atypiques (n=8) est constitué de 6 hommes (75%) et 2 femmes (25%), d'âge médian 79 ans (de 50 à 87 ans) tandis que le groupe MBL non-LLC (n=18) est quant à lui composé de 8 hommes (44%) et 10 femmes (56%), d'âge médian 73 ans (50 à 89 ans).

Il n'y a pas de différences significatives en ce qui concerne l'âge (p=0.6) et le sexe (p=0.22).

	Total (n=26)	MBL atypiques (n=8)	MBL non-LLC (n=18)	p
<b>Age</b>				
Médiane (ans)	73.5	79	73	0.6
Etendue (ans)	50-89	50-87	50-89	
<b>Sexe</b>				
Hommes	14 (54%)	6 (75%)	8 (44%)	0.22
Femmes	12 (46%)	2 (25%)	10 (56%)	
<b>Service</b>				
Hématologie clinique	17 (65%)	5 (63%)	12 (67%)	1
Autres	9 (35%)	3 (37%)	6 (33%)	

Tableau 13 : Principales caractéristiques démographiques des patients inclus

Au diagnostic, les taux d'hémoglobine médians dans les MBL atypiques et non-LLC sont respectivement de 14.1 et 14.2 g/dL (de 8.9 à 14.8 g/dL et de 10.5 à 15.3 g/dL). Seuls 4 d'entre eux (15%, 2 dans chaque groupe) présentaient une anémie au diagnostic, tous étant des hommes.

En ce qui concerne la numération plaquettaire, la médiane était de 238 G/L (162 à 384 G/L) pour l'ensemble des patients, 271 G/L dans le groupe MBL atypique, 209 G/L dans le groupe MBL non-LLC, et aucune thrombopénie n'a été notée.

Une seule neutropénie (1 G/L) a été détectée au diagnostic (groupe des MBL atypiques), bien qu'il n'y ait pas de différence dans le nombre de polynucléaires neutrophiles (PNN) entre les deux groupes ( $p=0.19$ ). La médiane de l'ensemble des MBL est de 4.8 G/L (1 à 8.4 G/L).

La lymphocytose totale médiane est de 5.19 G/L pour l'ensemble des patients au diagnostic, 5.62 G/L pour les MBL atypiques contre 5.07 G/L pour les MBL non-LLC, mais sans différence significative entre les deux groupes ( $p=0.29$ ). Dans ce premier groupe, 6 patients sur 8 (75%) présentent une hyperlymphocytose (lymphocytose  $> 4$  G/L) au diagnostic, contre 14 sur 18 (78%) dans le second, néanmoins sans différence statistiquement significative ( $p=1$ ).

La lymphocytose T médiane est de 2.37 G/L (0.8 à 4.1 G/L) pour les 26 patients, 3.05 G/L dans le groupe des MBL atypiques et 2.11 G/L dans le groupe des MBL non-LLC.

La médiane de la lymphocytose B pour l'ensemble de ces cas de MBL est de 1.78 G/L (0.5 à 4.8 G/L), conformément à la définition des MBL où le clone B doit être inférieur à 5 G/L. Dans les MBL atypiques, la lymphocytose B médiane s'établit à 2.09 G/L contre 1.39 G/L dans les MBL non-LLC, mais il n'y a pas de différence significative ( $p=0.26$ ).

Ces 26 cas de MBL (atypiques et non-LLC) ont le plus souvent un score de Matutes à 1 (42% des cas) et à 0 (31%) mais cela ne représente pas les différences entre les deux sous-groupes. Le groupe des MBL atypiques (où le CD5 est positif) est principalement constitué de clones B de score de Matutes à 2 (3 cas soit 37.5%) ou 3 (3 cas soit 37.5%). Le CD23 est négatif dans 5 cas (63%) et la chaîne légère du clone est le plus souvent de type kappa (6 cas, 75%). En revanche, dans le groupe des MBL non-LLC où le CD5 est négatif, 94% des clones ont un score de Matutes inférieur ou égal à 1 (50% ont un score à 1, 44% un score à 0). Le CD23 est négatif dans la grande majorité des clones (15/18 soit 83%). A l'instar des clones CD5+, la chaîne légère des clones CD5- est le plus souvent de type kappa (16 cas sur 18 soit 89%, sans différence significative).

Le dosage de la  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2m) a également été intégré à la base de données mais n'avait malheureusement pas été effectué pour tous les patients. La médiane chez les 12 patients pour lesquels elle a été dosée est de 2.6 mg/L (1.7 à 3.24), soit supérieure à la valeur de référence supérieure de 2.5 mg/L. Elle était de 2.65 mg/L pour les MBL atypiques contre 2.49 mg/L pour les MBL non-LLC, néanmoins sans différence significative ( $p=0.59$ ). Dans

chacun de ces deux groupes, 50% des patients (3 sur 6) avaient une  $\beta_2m$  supérieure à la valeur de référence.

Bien que recueillies pour chacun des 26 patients au diagnostic, les valeurs de LDH ne peuvent être comparées entre elles du fait de deux changements dans la technique de dosage entre 2005 et 2012 modifiant ainsi les valeurs de référence. Il est simplement possible de noter que 2 patients sur 26 (8%) avaient un taux de LDH légèrement supérieur à la normale au diagnostic, les deux étant des MBL non-LLC.

De la même manière, le dosage pondéral des immunoglobulines G, A et M n'a été réalisé que sur 16 patients : 7 MBL atypiques et 9 MBL non-LLC. Il n'y a pas de différences significatives entre les 2 groupes pour chacun de ces trois isotypes (IgG :  $p=0.75$ , IgA :  $p=0.31$ , IgM :  $p=0.34$ ).

50% et 33% des MBL atypiques et non-LLC respectivement ont une immunoglobuline monoclonale à l'immunofixation sérique ou à l'électrophorèse des protéines plasmatiques, soit 38% de ces 26 cas de MBL (10/26). La protéine monoclonale n'a pu être quantifiée que dans 3 cas mais dans la majorité de ces cas (70%) il s'agissait d'une IgM, contre 30% d'IgG. Cela est d'autant plus vrai dans le cas des MBL non-LLC où 83% des immunoglobulines monoclonales détectées sont de type IgM contre 17% d'IgG. De plus, la chaîne légère des immunoglobulines monoclonales détectées dans l'ensemble des cas de MBL était identique à celle de l'immunoglobuline de surface du clone B dans 8 cas sur 10 (80%).

Aucun myélogramme n'avait été réalisé chez les patients atteints de MBL atypiques, tandis que 31% (5/18) des patients porteurs d'une MBL non-LLC en ont bénéficié. L'un de ces 5 myélogrammes était malheureusement dilué et non contributif mais le patient avait une IgM monoclonale sérique. En revanche, en ce qui concerne les 4 autres myélogrammes, la lymphocytose médullaire médiane était de 20% (14 à 24%) sans notion d'atypies morphologiques et l'un d'eux présentait un pic à IgM. Dans 3 cas, l'immunophénotypage médullaire avait été réalisé et retrouvait le clone B décrit dans le sang, en moyenne à hauteur de 45% des lymphocytes médullaires. De plus, les 2 cas ayant une IgM étaient mutés MYD88.

	Total (n=26)	MBL atypiques (n=8)	MBL non-LLC (n=18)	p
<b>Hb</b>				
Médiane (g/dL)	14.2 <sup>‡</sup>	14.1	14.2 <sup>*</sup>	0.98
Etendue (g/dL)	8.9-15.3 <sup>‡</sup>	8.9-14.8	10.5-15.3 <sup>*</sup>	
<b>Plaquettes</b>				
Médiane (G/L)	238 <sup>‡</sup>	271	209 <sup>*</sup>	0.18
Etendue (G/L)	162-384 <sup>‡</sup>	195-367	162-384 <sup>*</sup>	
<b>PNN</b>				
Médiane (G/L)	4.8	3.9	5.1	0.19
Etendue (G/L)	1-8.4	1-6.7	2.7-8.4	
<b>Lymphocytose totale</b>				
Médiane (G/L)	5.19	5.62	5.07	0.29
Etendue (G/L)	1.93-10	2.05-10	1.93-6.82	
<b>Lymphocytose T</b>				
Médiane (G/L)	2.37	3.05	2.11	0.16
Etendue (G/L)	0.8-4.1	1.2-3.7	0.8-4.1	
<b>Lymphocytose B</b>				
Médiane (G/L)	1.78	2.09	1.39	0.26
Etendue (G/L)	0.5-4.8	0.8-4.8	0.5-4.7	
<b>Score de Matutes</b>				
0	8 (31%)	0 (0%)	8 (44%)	
1	11 (42 %)	2 (25%)	9 (50%)	
2	4 (15%)	3 (37.5%)	1 (6%)	
3	3 (12%)	3 (37.5%)	0 (0%)	
<b>Chaîne légère du clone B</b>				
Kappa	22 (85%)	6 (75%)	16 (89%)	0.56
Lambda	4 (15%)	2 (25%)	2 (11%)	
<b>β2m (mg/L)</b>				
Médiane	2.6 <sup>‡</sup>	2.65 <sup>*</sup>	2.49 <sup>*</sup>	0.59
Etendue	1.7-3.24 <sup>‡</sup>	1.8-3.24 <sup>*</sup>	1.7-3.13 <sup>*</sup>	
<b>IgG (g/L)</b>				
Médiane (g/L)	8.9 <sup>-</sup>	9.9 <sup>*</sup>	8.9 <sup>°</sup>	0.75
Etendue (g/L)	5.2-12.2 <sup>-</sup>	5.2-11.3 <sup>*</sup>	7.3-12.2 <sup>°</sup>	
<b>IgA (g/L)</b>				
Médiane (g/L)	1.25 <sup>-</sup>	1.15 <sup>*</sup>	1.38 <sup>°</sup>	0.31
Etendue (g/L)	0.7-3.1 <sup>-</sup>	0.7-1.67 <sup>*</sup>	0.7-3.1 <sup>°</sup>	
<b>IgM (g/L)</b>				
Médiane (g/L)	1.1 <sup>-</sup>	0.9 <sup>*</sup>	1.29 <sup>°</sup>	0.34
Etendue (g/L)	0.2-13.7 <sup>-</sup>	0.2-10.1 <sup>*</sup>	0.4-13.7 <sup>°</sup>	
<b>Electrophorèse et immunofixation sérique</b>				
Présence d'une immunoglobuline monoclonale	10 (38%)	4 (50 %)	6 (33%)	
Intégration possible du pic	3 (12%)	1 (25%) (7g/L)	2 (40%) (11.8 et 7.8 g/L)	
<b>Isotype de l'immunoglobuline monoclonale</b>				
IgM (Mλ ou Mκ)	7 (70%)	2 (50%)	5 (83 %)	0.24
IgG (Gλ ou Gκ)	3 (30%)	2 (50%)	1 (17%)	
<b>Myélogramme réalisé</b>	5 (19%)	0 (0%)	5 (31%)	

**Tableau 14 : Caractéristiques biologiques au diagnostic des patients atteints de MBL (\* : sur 6 patients, ° : sur 9 patients, † : sur 12 patients, ‡ : sur 16 patients, § : sur 17 patients, † : sur 25 patients)**



## B. Caractéristiques des MBL atypiques et non-LLC à la fin du suivi

Ces caractéristiques de fin de suivi sont résumées dans les tableaux 15 et 16.

La durée médiane de suivi tout au long du recueil a été de 48.5 mois soit environ 4 ans (allant de 6 à 93 mois). Le suivi des MBL atypiques est de 58.5 mois (6 à 93 mois) contre 31.5 mois (de 20 à 58 mois) pour les MBL non-LLC, néanmoins sans différence significative ( $p=0.1$ ).

Le taux d'hémoglobine médian s'établit à 13.3 g/dL (8.8 à 15.6 g/dL) sur les 25 patients pour lesquels on disposait d'une NFS à la fin de leur suivi, parmi lesquels 8 (32%) présentaient une anémie (4 hommes et 4 femmes). L'hémoglobine en fin de suivi semble plus basse pour les MBL non-LLC que pour les MBL atypiques, mais sans différence significative ( $p=0.07$ ). Alors que dans le groupe des MBL atypiques l'hémoglobine médiane est identique au diagnostic et à la fin du suivi (14.1 g/dL), elle est significativement inférieure à la fin du suivi dans le groupe des MBL non-LLC ( $p=0.01$ ).

A la fin du recueil, la numération plaquettaire était normale (plaquettes entre 150 et 450 G/L) pour 20 des 25 patients (80%). Les 5 thrombopénies (2 parmi les MBL atypiques et 3 parmi les MBL non-LLC) sont néanmoins très modérées puisque leur médiane est de 141 G/L. De plus, dans chacun des deux groupes, les numérations plaquettaires ne sont pas statistiquement différentes entre le moment du diagnostic et la fin de suivi (MBL atypiques :  $p=0.31$ , MBL non-LLC :  $p=0.08$ ).

Le suivi des polynucléaires neutrophiles n'a pas non plus montré de différences entre ces deux groupes ( $p=0.19$ ), la médiane dans les MBL atypiques s'établissant à 4 G/L (2.4 à 7 G/L) contre 4.7 G/L dans les MBL non-LLC (2.8 à 11.2 G/L). De plus, aucun cas de neutropénie n'était signalé à la fin du recueil.

A l'arrivée, la lymphocytose totale médiane pour les 26 patients s'établissait à 5 G/L à la fin du suivi (1.7 à 15.1 G/L), sans différence significative entre les deux groupes ( $p=0.49$ ). 75% des patients ayant une MBL atypique présentaient une hyperlymphocytose à la fin du suivi contre 44% des patients ayant une MBL non-LLC ( $p=0.22$ ).

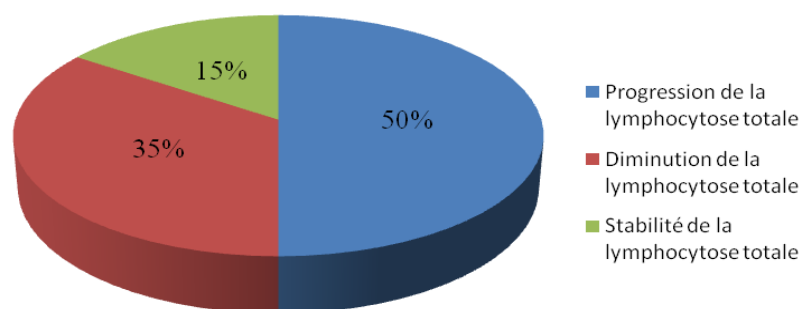
	MBL atypiques (n=8)			MBL non-LLC (n=18)		
	Au diagnostic	A la fin du suivi	p	Au diagnostic	A la fin du suivi	p
<b>Hb</b>						
Médiane (g/dL)	14.1	14.1	0.38	14.2 <sup>*</sup>	12.7 <sup>-</sup>	0.01
Etendue (g/dL)	8.9-14.8	12.7-15.1		10.5-15.3 <sup>*</sup>	8.8-15.6 <sup>-</sup>	
<b>Plaquettes</b>						
Médiane (G/L)	271	201	0.31	209 <sup>*</sup>	212 <sup>-</sup>	0.08
Etendue (G/L)	195-367	144-390		162-384 <sup>*</sup>	115-493 <sup>-</sup>	
<b>Lymphocytose totale</b>						
Médiane (G/L)	5.62	5	0.55	5.07	4.56	0.58
Etendue (G/L)	2.1-10	2.6-15.1		1.9-6.8	1.7-9.3	

**Tableau 15 : Comparaison des paramètres biologiques des deux groupes de MBL au diagnostic et à la fin de suivi (⁻ : sur 16 patients, • : sur 17 patients)**

En valeur absolue, la lymphocytose totale médiane a progressé de 0.45 G/L sur l'ensemble du suivi (allant d'une diminution de 3.7 G/L à une augmentation de 5.1 G/L), en particulier dans le groupe des MBL atypiques où la progression médiane est de 0.84 G/L contre 0.09 G/L dans le groupe des MBL non-LLC. En considérant que la lymphocytose a été stable pour des variations maximales de plus ou moins 0.5 G/L, 63% (5/8) des MBL atypiques ont vu leur lymphocytose progresser (37% ont régressé) tandis que dans le groupe des MBL non-LLC la lymphocytose a augmenté dans 45% (8/18) des cas (33% ont diminué, 22% sont restées stables). Parmi les 13 patients atteints de MBL dont la lymphocytose a augmenté, 9 (50%) possédaient déjà une hyperlymphocytose au diagnostic contre 11 (61%) à la fin du suivi. Au final, la lymphocytose totale a progressé dans 50% des MBL toutes confondues, régressé dans 35% des cas et était stable dans 15% (figure 32).

Parmi les données clinico-biologiques recueillies, les patients dont la lymphocytose a diminué montrent peu de caractéristiques communes : 8 d'entre eux (89%) avaient une hyperlymphocytose au diagnostic mais trois seulement une immunoglobuline monoclonale sérique (deux IgM et une IgG) et un cas est muté MYD88.

En rapportant cette évolution à la durée de suivi pour chacun des patients, le taux d'accroissement médian calculé de la lymphocytose totale est de 0.07 G/L/an (-2.56 à 1.1 G/L/an). Celui des MBL atypiques (0.35 G/L/an) n'est pas statistiquement différent de celui des MBL non-LLC (0.002 G/L/an, p=0.57).



**Figure 32 : Evolution de la lymphocytose totale à la fin du suivi des 26 cas de MBL**

Les consultations menées à la fin du suivi montrent que 92% des patients n'ont eu absolument aucune évolution clinique durant cette période : aucun patient n'a développé de véritable critère de lymphome ou de LLC ni aucun syndrome tumoral même pour certains patients dont la lymphocytose a fortement progressé (jusqu'à 15 G/L par exemple), avec néanmoins la réserve due à l'absence d'immunophénotypage de contrôle. Seuls 2 patients (8%) sont décédés et les causes ne sont pas liées à la MBL : l'un parmi les MBL atypiques d'un accident de la circulation et l'autre parmi les MBL non-LLC d'un infarctus du myocarde.

Les lymphocytoses B et T, la concentration en  $\beta 2m$ , en IgG, IgA, IgM ainsi que la quantification de l'immunoglobuline monoclonale n'ont pas pu être évaluées au dernier point de suivi du fait de l'absence de données.

	Total (n=26)	MBL atypiques (n=8)	MBL non LLC (n=18)	p
<b>Hb</b>				
Médiane (g/dL)	13.3 <sup>#</sup>	14.1	12.7 <sup>-</sup>	0.07
Etendue (g/dL)	8.8-15.6 <sup>#</sup>	12.7-15.1	8.8-15.6 <sup>-</sup>	
<b>Plaquettes</b>				
Médiane (G/L)	212 <sup>#</sup>	201	212 <sup>-</sup>	0.95
Etendue (G/L)	115-493 <sup>#</sup>	144-390	115-493 <sup>-</sup>	
<b>PNN</b>				
Médiane (G/L)	4.3 <sup>†</sup>	4	4.7 <sup>*</sup>	0.19
Etendue (G/L)	2.4-11.2 <sup>†</sup>	2.4-7	2.8-11.2 <sup>*</sup>	
<b>Lymphocytose totale</b>				
Médiane (G/L)	5	5	4.56	0.49
Etendue (G/L)	1.7-15.1	2.6-15.1	1.7-9.3	
<b>Evolution de la lymphocytose totale</b>				
Médiane (G/L)	+0.45	+0.84	+0.09	0.85
Etendue (G/L)	-3.7-+5.1	-3.7-+5.1	-2.72-+4.35	
Progression	13 (50%)	5 (63%)	8 (45%)	
Diminution	9 (35%)	3 (37%)	6 (33%)	
Stabilité	4 (15%)	0 (0%)	4 (22%)	
<b>Taux d'accroissement de la lymphocytose totale</b>				
Médiane (G/L/an)	0.07	0.35	0.002	0.57
Etendue (G/L/an)	-2.56-+1.1	-2-+1.1	-2.56-+0.88	
<b>Evolution clinique</b>				
Aucune	24 (92%)	7 (88%)	17 (94%)	0.53
Autre (décès...)	2 (8%)	1 (12%)	1 (6%)	
<b>Durée de suivi</b>				
Médiane (mois)	48.5	31.5	58.5	0.1
Etendue (mois)	6-93	20-58	6-93	

**Tableau 16 : Caractéristiques clinico-biologiques en fin de suivi des patients atteints de MBL ( - : sur 16 patients, \* : sur 17 patients, # : sur 24 patients, † : sur 25 patients)**

### C. Caractéristiques des MBL porteuses de la mutation L265P de MYD88

La recherche de la mutation L265P de MYD88 a pu être réalisée sur 23 des 26 patients atteints de MBL (88%) : 7 MBL atypiques et 16 MBL non-LLC. Sur les 3 patients pour lesquels il n'a pas été possible d'évaluer ce paramètre, le matériel génétique conservé était insuffisant ou absent pour deux d'entre eux (groupe des MBL non-LLC), et il s'agissait d'ARN pour le troisième (groupe des MBL atypiques).

Cette mutation a été retrouvée dans 26% des cas (6/23), tous par PCR-digestion. Deux d'entre eux étaient faiblement positifs en PCR et ont été confirmés par séquençage. Tous les

cas négatifs (n=17) ont également été contrôlés négatifs en séquençage. Les 6 sujets positifs étaient tous hétérozygotes pour cette mutation. Parmi ces patients mutés, deux d'entre eux sont atteints de MBL atypique (2/7, soit 29% des MBL atypiques) et quatre de MBL non-LLC (4/16, soit 25% des MBL non-LLC). Il n'y a pas davantage de patients mutés parmi les MBL atypiques comparé aux MBL non-LLC (p=1) (tableau 17).

	Total (n=23)	MBL atypiques (n=7)	MBL non LLC (n=16)	p
<b>Statut mutationnel de MYD88</b>				
Muté L265P	6 (26%)	2 (29%)	4 (25%)	1
Sauvage	17 (74%)	5 (71%)	12 (75%)	

**Tableau 17 : Statut mutationnel de MYD88 en fonction des MBL**

### 1. Au diagnostic

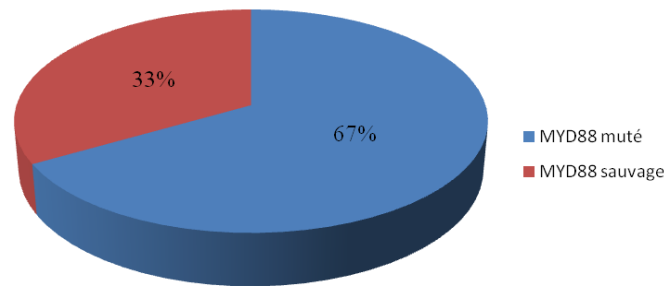
Il n'y a pas de différence statistiquement significative en ce qui concerne l'âge (p=0.21) et le sexe (p=0.64) entre les patients mutés MYD88 et les patients porteurs de l'allèle sauvage.

Au diagnostic, le taux d'hémoglobine, la numération plaquettaire et le taux de PNN ne montrent pas de différences significatives entre les patients mutés et les patients non mutés (respectivement p=1, p=0.2, p=0.97).

En revanche, chez les patients mutés, la lymphocytose totale médiane au diagnostic est de 4.54 G/L (1.93-5.43 G/L) contre 5.8 G/L (3.24-10 G/L) chez les patients non mutés, ce qui est significativement différent (p=0.03). Néanmoins, en termes de lymphocytose B, il n'y a pas de différence entre ces deux groupes (p=0.31).

La médiane du dosage de la  $\beta$ 2m est de 2.6 mg/L chez les patients non mutés contre 1.75 mg/L chez les patients mutés. Néanmoins, il n'est pas possible de conclure sur ces résultats étant donné que la  $\beta$ 2m n'a été dosée que pour deux patients mutés et huit patients non mutés.

Comme mentionné précédemment, 10 patients atteints de MBL ont une Ig monoclonale sérique, 4 parmi les MBL atypiques et 6 parmi les MBL non-LLC. 9 d'entre eux ont pu être étudiés : 6 ayant une IgM et 3 ayant une IgG. 6 patients sur 9 étaient mutés MYD88 : 2 MBL atypiques et 4 MBL non-LLC. Ainsi, 67% des patients porteurs d'une Ig monoclonale sont mutés pour MYD88 (figure 33).



**Figure 33 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 parmi les patients ayant une immunoglobuline monoclonale sérique de type IgG et IgM (n=9)**

Réciproquement, en se plaçant cette fois-ci parmi les 6 patients mutés, on observe que 100% d'entre eux possèdent une immunoglobuline (Ig) monoclonale à l'immunofixation sérique. En revanche, parmi les 17 patients non mutés MYD88, seuls 3 ont une Ig monoclonale (18%), ce qui montre une différence statistiquement très significative ( $p=0.0008$ ). L'immunoglobuline monoclonale des 6 patients mutés est de type IgM dans 83% des cas (5/6) et de type IgG dans 17% des cas (1/6) (figure 34). Sur ces 5 patients mutés et qui possèdent une IgM monoclonale, 4 appartiennent au groupe des MBL non-LLC (80%). Ainsi, dans le groupe des MBL non-LLC, 100% des patients mutés (4/4) ont une immunoglobuline monoclonale de type IgM $\kappa$  (figure 35). Une immunoglobuline monoclonale n'est présente que dans 20% (1/5) et 17% (2/12) des cas non mutés de MBL atypiques et non-LLC respectivement. Les deux patients mutés du groupe des MBL atypiques se répartissent en un sujet ayant une IgM $\kappa$  et un sujet ayant une IgG $\kappa$  (figure 36). Ainsi, chez 100% des patients mutés, la chaîne légère de l'immunoglobuline monoclonale détectée est de type kappa.

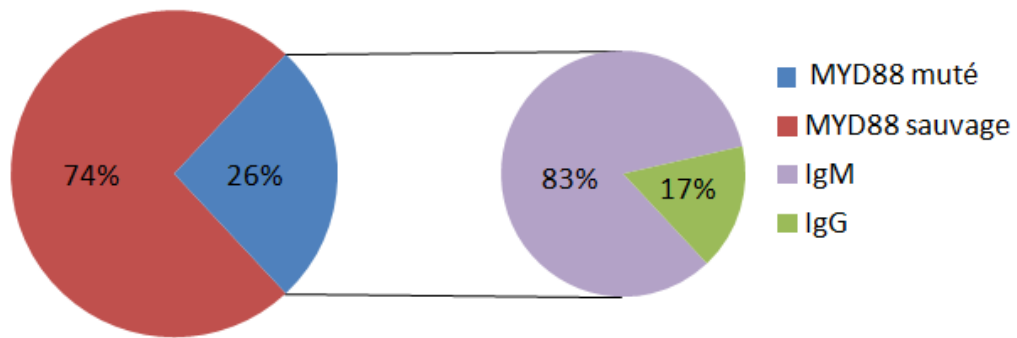


Figure 34 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 parmi l'ensemble des MBL (n=23) et isotypes des immunoglobulines monoclonales

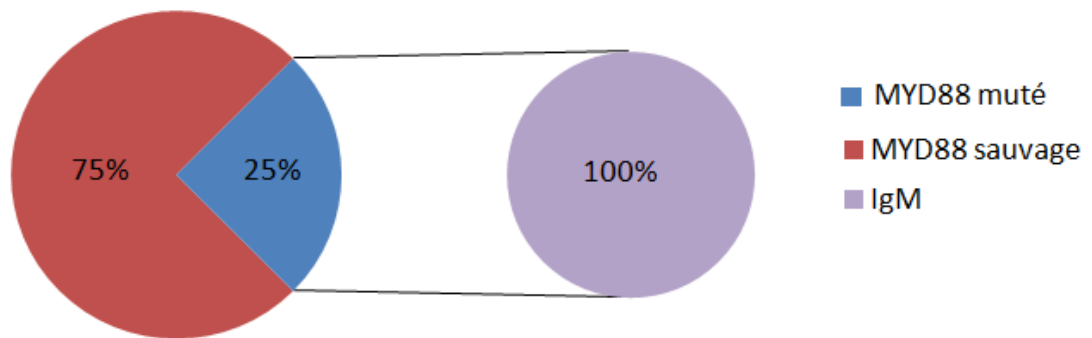


Figure 35 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 parmi les MBL non-LLC (n=16) et isotype de l'immunoglobuline monoclonale

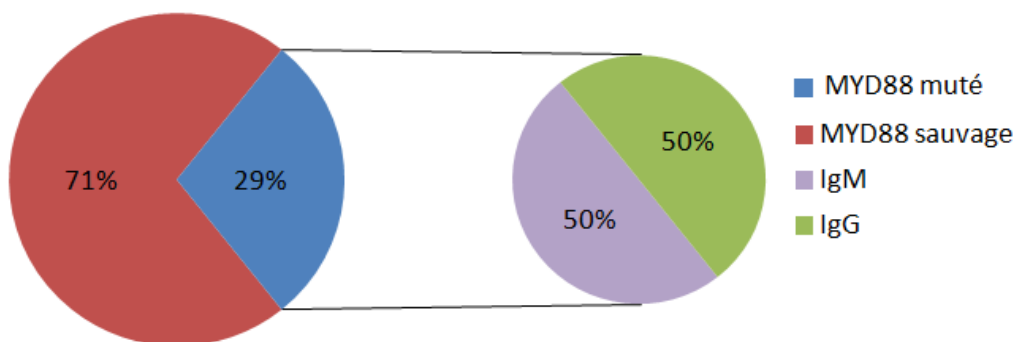


Figure 36 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 parmi les MBL atypiques (n=7) et isotypes des immunoglobulines monoclonales

Ces résultats sont corroborés par la comparaison des taux d'immunoglobulines au diagnostic. Bien que les taux d'IgG et d'IgA entre les deux groupes soient comparables (respectivement  $p=0.29$  et  $p=0.29$ ), le taux médian d'IgM chez les patients mutés est très largement supérieur à celui des patients non mutés : il est respectivement de 11.9 g/L (0.7-16.9 g/L) contre 0.5 g/L (0.2-2.1 g/L) et cette différence est significative ( $p=0.02$ ).

L'ensemble des résultats des patients mutés et non mutés MYD88 au moment du diagnostic sont résumés dans le tableau 18.



	MYD88 muté L265P (n=6)	MYD88 sauvage (n=17)	p
<b>Age</b>			
Médiane (ans)	66	72	0.21
Etendue (ans)	50-82	50-89	
<b>Sexe</b>			
Hommes	4 (67%)	8 (47%)	0.64
Femmes	2 (33%)	9 (53%)	
<b>Hb</b>			
Médiane (g/dL)	14.1	14.3*	1
Etendue (g/dL)	13.2-15	10.5-15.3*	
<b>Plaquettes</b>			
Médiane (G/L)	335	246*	0.2
Etendue (G/L)	162-384	169-336*	
<b>PNN</b>			
Médiane (G/L)	4.7	4.8	0.97
Etendue (G/L)	3.3-6.7	2.7-8.4	
<b>Lymphocytose totale</b>			
Médiane (G/L)	4.54	5.8	0.03
Etendue (G/L)	1.93-5.43	3.24-10	
<b>Lymphocytose B</b>			
Médiane (G/L)	1.41	1.91	0.31
Etendue (G/L)	0.72-3.11	0.51-4.80	
<b>β2m (mg/L)</b>			
Médiane	1.75°	2.6*	0.04
Etendue	1.7-1.8°	1.99-3.1*	
<b>IgG (g/L)</b>			
Médiane (g/L)	10.1 <sup>†</sup>	8.9 <sup>‡</sup>	0.29
Etendue (g/L)	7.3-12 <sup>†</sup>	5.2-11.3 <sup>‡</sup>	
<b>IgA (g/L)</b>			
Médiane (g/L)	1.15 <sup>†</sup>	1.4 <sup>‡</sup>	0.29
Etendue (g/L)	0.7-1.67 <sup>†</sup>	0.7-3.1 <sup>‡</sup>	
<b>IgM (g/L)</b>			
Médiane (g/L)	11.9 <sup>†</sup>	0.5 <sup>‡</sup>	0.02
Etendue (g/L)	0.7-16.9 <sup>†</sup>	0.2-2.1 <sup>‡</sup>	
<b>Présence d'une immunoglobuline monoclonale</b>			
	6 (100%)	3 (18%)	0.0008
<b>Isotype de l'immunoglobuline monoclonale</b>			
IgM	5 (83%)	1 (6%)	
IgG	1 (17%)	2 (12%)	

Tableau 18 : Principales caractéristiques biologiques des MBL en fonction du statut mutationnel de MYD88 au diagnostic (° : sur 2 patients, † : sur 5 patients, \* : sur 8 patients, ‡ : sur 9 patients, † : sur 16 patients)

En ce qui concerne les 9 patients du groupe « contrôle » (pour rappel, constitué selon les mêmes critères de sélection que les MBL mais avec un syndrome tumoral, le plus souvent splénique), la lymphocytose totale était significativement inférieure à celle des patients atteints de MBL (2.05 G/L contre 5.19 G/L,  $p=0.002$ ), de même que la lymphocytose B (0.64 G/L contre 1.78 G/L,  $p=0.008$ ).

5 de ces 9 patients (56%) possèdent une Ig monoclonale dont 4 de type IgM (44%). En revanche, les études de biologie moléculaire montrent qu'aucun de ces 9 patients n'est muté MYD88.

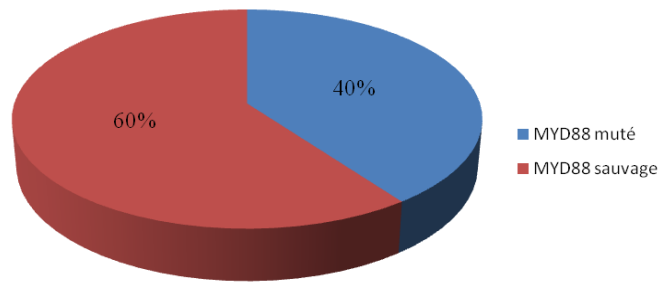
## 2. A la fin du suivi

L'impact de la présence de la mutation L625P de MYD88 a également été étudié sur les patients atteints de MBL à la fin de leur suivi. Le suivi médian était de 55.5 mois (26-73 mois) pour les patients mutés et de 47 mois (6-93 mois) pour les patients sauvages ( $p=0.75$ ).

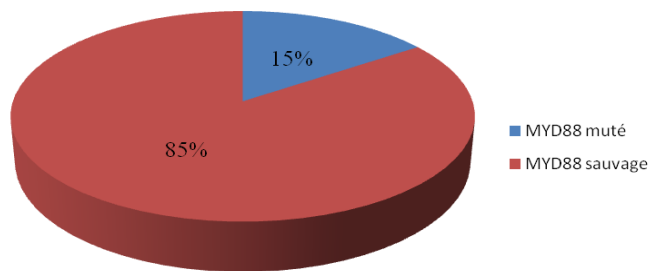
A la fin de ce suivi, il n'y a pas de différences significatives entre les deux groupes en ce qui concerne le taux d'hémoglobine, la numération plaquettaire et le taux de PNN (respectivement  $p=1$ ,  $p=0.09$  et  $p=0.68$ ).

Contrairement à ce qui avait été trouvé au diagnostic pour la lymphocytose totale, il n'y a plus de différence en fin de suivi entre le groupe muté (5.31 G/L en médiane) et le groupe non muté (5 G/L en médiane,  $p=0.78$ ). Ceci peut être dû au fait que la lymphocytose totale semble avoir davantage progressé dans le groupe muté (0.93 G/L sur l'ensemble du suivi contre -0.32 G/L dans le groupe non muté) bien que ces résultats ne soient pas statistiquement différents.

La recherche de la mutation L265P de MYD88 a été réalisée sur 10 des 13 patients dont la lymphocytose avait progressé à la fin du suivi : 4 d'entre eux étaient mutés (40%) et se répartissent en 2 cas de MBL atypiques et 2 cas de MBL non-LLC (figure 37). En revanche, il n'y a que 2 cas mutés sur les 13 MBL dont la lymphocytose avait régressé ou était stable (15%), mais sans différence statistiquement significative ( $p=0.34$ ) (figure 38). Ces 2 cas sont des MBL non-LLC. Ainsi, 67% des patients mutés ont vu leur lymphocytose progresser au cours du suivi (4 patients sur 6) contre 35% des patients non mutés (6/17).



**Figure 37 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 parmi les MBL dont la lymphocytose a progressé à la fin du suivi (n=10)**



**Figure 38 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 parmi les MBL dont la lymphocytose a diminué ou est restée stable à la fin du suivi (n=13)**

Les principaux résultats des patients mutés et non mutés MYD88 à la fin du suivi sont résumés dans le tableau 19.

	MYD88 muté L265P (n=6)	MYD88 sauvage (n=17)	p
<b>Hb</b>			
Médiane (g/dL)	14.1 <sup>-</sup>	13.6 <sup>*</sup>	1
Etendue (g/dL)	10.5-14.4 <sup>-</sup>	8.8-15.6 <sup>*</sup>	
<b>Plaquettes</b>			
Médiane (G/L)	310 <sup>-</sup>	176 <sup>*</sup>	0.09
Etendue (G/L)	178-390 <sup>-</sup>	115-352 <sup>*</sup>	
<b>PNN</b>			
Médiane (G/L)	4.2	4.1 <sup>*</sup>	0.68
Etendue (G/L)	3.2-6.2	2.4-11.2 <sup>*</sup>	
<b>Lymphocytose totale</b>			
Médiane (G/L)	5.31	5	0.78
Etendue (G/L)	1.7-8.4	2-15.1	
<b>Evolution de la lymphocytose totale</b>			
Médiane (G/L)	0.93	-0.32	0.26
Etendue (G/L)	-0.8-+4.35	-3.68-+5.1	
Progression	4 (67%)	6 (35%)	0.34
Diminution ou stabilité	2 (33%)	11 (65%)	
<b>Taux d'accroissement de la lymphocytose totale</b>			
Médiane (G/L/an)	0.26	-0.22	0.18
Etendue (G/L/an)	-0.13-+0.86	-2.56-+1.06	
<b>Evolution clinique</b>			
Aucune	6 (100%)	15 (88%)	1
Autre (décès)	0 (0%)	2 (12%)	
<b>Durée de suivi</b>			
Médiane (mois)	55.5	47	0.75
Etendue (mois)	26-73	6-93	

Tableau 19 : Principales caractéristiques biologiques des MBL en fonction du statut mutationnel de MYD88 à la fin du suivi (° : sur 6 patients, \* : sur 16 patients)

#### D. Caractéristiques des MBL ayant une IgM monoclonale sérique ou non

7 patients atteints de MBL sur 26 ont une IgM monoclonale (27%). La mutation L265P de MYD88 est présente chez 83% d'entre eux contre seulement 6% des patients sans Ig monoclonale ou ayant une IgG, ce qui montre une différence significative (p=0.001, 3 patients n'ont pas pu être testés en biologie moléculaire). Ainsi, étudier les MBL à IgM revient quasiment à étudier les MBL mutées MYD88 et inversement, étudier les MBL à IgG ou sans Ig monoclonale revient quasiment à étudier les MBL non mutées. Les différences sont donc peu importantes entre ces deux groupes et, pour être exhaustif, leurs caractéristiques sont résumées ici.

## 1. Au diagnostic

Il n'y a pas de différences significatives en termes d'âge au diagnostic ( $p=0.95$ ), de sexe ( $p=0.39$ ), d'hémoglobine ( $p=0.72$ ), de numération plaquettaire ( $p=0.98$ ) et de nombre de PNN ( $p=0.93$ ).

En revanche, comme pour les patients mutés MYD88, la lymphocytose totale initiale est significativement différente entre les deux groupes ( $p=0.006$ ). La médiane chez les patients ayant une IgM monoclonale est de 4.05 G/L (1.93-5.29 G/L) contre 5.67 G/L (3.24-10 G/L) pour les autres patients. La lymphocytose B n'est néanmoins pas différente entre ces deux groupes ( $p=0.33$ ).

Comme on pouvait s'y attendre, le taux d'IgM des patients ayant une IgM monoclonale est significativement supérieur à celui des autres patients ( $p=0.001$ ). La médiane est de 11 g/L dans le premier groupe contre 0.6 g/L dans le second.

## 2. A la fin du suivi

A la fin du suivi, les patients atteints de MBL et ayant une IgM monoclonale ne présentent pas davantage de différences avec les patients sans Ig monoclonale ou avec une IgG en termes d'hémoglobine, de plaquettes et de PNN ( $p=0.37$ ,  $p=0.21$ ,  $p=0.35$ ).

Contrairement au diagnostic, la lymphocytose totale n'est plus significativement différente entre ces deux groupes ( $p=0.13$ ), même si la médiane semble rester inférieure dans le groupe des MBL à IgM (4.02 G/L contre 5 G/L). Il n'y a pas non plus davantage de MBL à IgM qui ont progressé, aussi bien en terme de nombre de patients ( $p=1$ ) qu'en terme d'augmentation de la lymphocytose ( $p=1$ ).

### III. Discussion

Dans une revue de la littérature publiée en 2010, Shanafelt et al. proposaient de nouveaux champs d'investigations pour de futures études sur les MBL. Deux de ces nouvelles perspectives étaient : 1) d'étudier le suivi des patients atteints de MBL atypiques et non-LLC, 2) de définir et de mieux caractériser les évènements biologiques et génétiques survenant dans les cellules clonales B [56]. En effet, la très grande majorité des publications concernent les MBL LLC-like du fait de leur fréquence bien plus grande et de leur risque potentiel mais faible d'évolution vers une LLC. Parallèlement, la découverte de la mutation L265P de MYD88 dans la quasi-totalité des cas de maladie de Waldenström et à une fréquence bien plus faible dans d'autres LNH B remet en question les mécanismes de la lymphomagénèse [33,77–79]. Néanmoins, à notre connaissance, son étude n'a encore jamais été réalisée chez les patients atteints de MBL. Dans cet esprit, nous rapportons donc ici les résultats du suivi à moyen terme et de la fréquence de cette mutation chez 26 patients atteints de MBL atypiques et non-LLC.

La sélection de nos cas a également été basée sur le profil immunophénotypique du clone B exprimé sous la forme du score de Matutes-Moreau (MBL LLC-like si le score est supérieur ou égal à 4). Ce choix est expliqué par la façon dont les cas ont été triés à partir de la base de données globale de cytométrie en flux du laboratoire. Il s'agit cependant d'un classement un peu différent de celui utilisé le plus souvent dans la littérature et qui repose principalement sur l'expression des marqueurs CD5 et CD23. De fait, on peut discuter le classement retenu pour certaines de nos MBL non LLC-like : il s'agit des trois cas CD5+ et CD23+. Nous pensons qu'il ne s'agit pas de clones de MBL LLC-like car le reste du profil montre une Ig de surface moyenne à forte, un CD79b fort et un FMC7 positif, soit un score de Matutes bas (inférieur à 3) typiquement en défaveur d'un profil de type LLC.

Dans 85% des cas (22/26), la chaîne légère du clone était de type kappa. Cette fréquence élevée a déjà été décrite dans deux études précédentes et est tout à fait en accord avec leurs résultats : 84 % selon Ghia et al. et 87% selon Shim et al. [86,87] Néanmoins, le nombre de patients inclus dans chacune des études est faible et il est impossible de conclure à une surreprésentation de la chaîne kappa dans les MBL pour l'instant. De plus grandes cohortes sont donc nécessaires afin de confirmer ou non ces résultats. On notera également 2 cas où la chaîne légère du clone B et la chaîne légère de l'immunoglobuline monoclonale

étaient discordantes. Ces deux patients avaient une IgM monoclonale sérique : l'un n'était pas muté pour MYD88 et le second n'a pas pu être testé en biologie moléculaire par manque de matériel génétique.

Cette étude rétrospective a été menée avec une durée de suivi médiane de 4 ans, soit autant que les principales études de suivi à moyen et long terme : 3 ans pour Fazi et al., 4.1 ans pour Mulligan et al. et 6.7 ans pour Rawstron et al. [50,51,85]

Avec 14 hommes pour 12 femmes, la forte prédominance masculine observée dans les précédentes études n'a pas été retrouvée ici. Néanmoins, cette caractéristique avait été déterminée sur la base d'études épidémiologiques de grande ampleur, incluant entre 600 et 5000 patients, contrairement au faible nombre de patients recrutés ici [39–42]. En revanche, l'âge médian de ces patients (73.5 ans) est tout à fait comparable avec les résultats décrits dans ces mêmes études et confirme qu'il s'agit d'une affection du sujet âgé.

Sur les 26 patients au départ, deux sont décédés durant la période de suivi mais de causes non liées à leur MBL, aucune évolution clinique n'ayant donc été notée pour les autres. Sur un suivi médian un peu plus long (6.7 ans), Rawstron et al. avaient observés 4 décès sur 185 MBL qui étaient liés au développement d'une LLC, et il s'agissait également de patients âgés (74 ans de médiane) [51].

Rawstron et al. ont montré qu'un taux d'hémoglobine inférieur à 12.5 g/dL était un facteur prédictif de décès [51]. Dans notre série, à la fin du suivi, il était significativement inférieur dans le groupe des MBL non-LLC comparé au taux initial (12.7 contre 14.2 g/dL), ce qui n'était pas le cas pour les MBL atypiques. Ce résultat est à rapprocher de la notion (discutée dans la littérature) d'une évolution moins favorable des MBL non LLC-like par rapport aux MBL LLC-like. Néanmoins, cette notion est à nuancer étant donné que les causes d'anémies chez les personnes âgées sont multiples, d'autant plus après 4 ans de suivi.

Dans le sous-groupe des MBL cliniques, les patients présentent le plus souvent une hyperlymphocytose, laquelle constitue le motif de consultation, et le clone B est supérieur à 0.5 G/L, le plus souvent supérieur à 1.5 G/L. Il s'oppose aux MBL de screening qui ne sont dépistées qu'à l'occasion d'études épidémiologiques étant donné la très petite taille du clone B (inférieur à 0.5 G/L mais le plus souvent inférieur à 0.05 G/L). [48] De par le principe même de sélection des patients de la série, les patients étudiés ici rentrent dans le cadre des MBL cliniques puisque la majorité d'entre eux consultaient pour un bilan

d'hyperlymphocytose. La médiane de la lymphocytose B était de 1.78 G/L et celle-ci était supérieure à 0.5 G/L pour tous les patients, quel que soit le type de MBL (atypique ou non-LLC), avec la réserve néanmoins qu'il est difficile d'affirmer que cette subdivision MBL clinique/MBL de screening soit également applicable aux MBL atypiques et non-LLC. En effet il n'y a pas à notre connaissance d'étude ayant porté uniquement sur les MBL atypiques et non-LLC, la grande majorité des publications reposent surtout voire uniquement sur les MBL LLC-like.

La lymphocytose totale a globalement peu progressé pour l'ensemble des MBL, 0.45 G/L en médiane. Néanmoins, cela ne reflète pas d'importantes différences :

- Il semble que la lymphocytose ait beaucoup plus progressé dans les MBL non-LLC (+0.84 G/L) que dans les MBL atypiques (+0.09 G/L) bien que les résultats ne soient pas statistiquement significatifs, mais cela est probablement lié à la taille réduite de l'échantillon.
- La lymphocytose a également davantage progressé chez les patients mutés MYD88, aussi bien en valeur absolue qu'en nombre de patients. Pourtant, la lymphocytose initiale était significativement inférieure à celle des patients porteurs de l'allèle sauvage.
- Les variations de la lymphocytose s'étendent sur une large plage (d'une diminution de 3.7 G/L à une augmentation de 5.1 G/L en médiane) révélant ainsi qu'environ 50% des clones toutes MBL confondues ont progressé tandis que 35% ont régressé. La littérature fait état de la régression voire de la disparition des clones B, avec la réserve toutefois que ces études de suivi ont très largement porté sur les MBL LLC-like. Sur une très petite série de trois cas de MBL non-LLC mais dont le suivi était de 15 ans, la lymphocytose totale et la lymphocytose B avaient fortement diminué pour un patient [88]. Selon Fazi et al., 55.6 % des MBL atypiques et 33.3% des MBL non-LLC avaient un clone B transitoire après un suivi de 34 mois, contre 10% des MBL LLC-like [50]. Bien qu'il s'agissait dans cette étude de MBL de screening, et ayant donc un clone B initial de petite taille, les résultats semblent assez proches de ce qui a été trouvé pour ces MBL cliniques : 37% des MBL atypiques et 33% des MBL non-LLC ont vu leur lymphocytose totale régresser. Cependant, il n'a pas été possible d'évaluer le clone B lui-même à la fin du suivi (absence de cytométrie) et il est donc impossible d'affirmer que ce clone avait disparu. Il est possible toutefois que nos cas où la lymphocytose avait régressé correspondent à la notion de « clone transitoire » décrite dans la littérature.

A la fin du suivi, 11 cas présentent une lymphocytose totale strictement supérieure à 5 G/L sans syndrome tumoral (avec la restriction de l'absence d'immunophénotypage final qui empêche d'évaluer la part exacte du clone B dans cette valeur). Ce seuil de 5 G/L est repris



par analogie avec celui proposé par l'OMS pour le classement en LLC mais dans nos cas il ne s'agit pas de LLC stade 0 selon la classification de Rai car le score de Matutes-Moreau initial est strictement inférieur à 4 et l'on peut supposer avec beaucoup de vraisemblance qu'il n'a pas varié en cours de suivi. Le taux de progression des MBL LLC-like en LLC a été estimé à 1.1%/an [51] mais il n'y a pas d'études équivalentes pour les deux autres types de MBL à notre connaissance. Si dans la majorité des cas de notre série la progression de la lymphocytose était faible, un patient a atteint 15.1 G/L en fin de suivi pour une valeur initiale de 10 G/L (dont 4.8 G/L de cellules B clonales, patient n°5). Néanmoins, lui non plus ne présentait ni syndrome tumoral ni symptômes B après 5 ans de suivi. Il n'était pas muté MYD88 et n'avait pas d'Ig monoclonale sérique. Le score de Matutes initial était de 1 ce qui rend peu probable une évolution en LLC. Ce cas particulier ainsi que les 10 autres posent la question du classement de la lymphopathie ainsi développée après plusieurs années d'évolution, exclusivement leucémique, asymptomatique, mais avec un taux de lymphocytes circulants supérieur à 5 G/L et un score de Matutes excluant a priori une LLC. Ces formes sont non classables selon les critères diagnostiques actuels de l'OMS.

La mutation L265P de MYD88 a été retrouvée dans 26% des cas de notre série de MBL, toutes formes confondues avec une proportion équivalente dans les deux sous-groupes (29% des MBL atypiques et 25% des MBL non-LLC). Ce taux est nettement plus élevé que celui rapporté dans la LLC (2.9%), les lymphomes de la zone marginale splénique (environ 10%) et ganglionnaire (0%) mais bien inférieur à celui des MGUS à IgM (environ 50%) et la maladie de Waldenström (plus de 90%) [33,73,77-79]. La très grande prédominance de cette mutation de MYD88 dans les lymphopathies à différenciation lymphoplasmocytaire amène à discuter de la place de nos cas de MBL porteurs de la mutation par rapport aux MGUS à IgM, au lymphome lymphoplasmocytaire et à la maladie de Waldenström.

Tout d'abord, le lien entre la présence d'un pic monoclonal à IgM et la présence de cette mutation de MYD88 est parfaitement retrouvé dans notre étude, rejoignant les résultats connus dans les MGUS à IgM, selon que l'on aborde l'entité par la recherche d'un clone B circulant minima ou par celle d'une immunoglobuline monoclonale.

Pour la discussion avec la maladie de Waldenström, seulement 4 patients ont pu bénéficier d'un myélogramme contributif au moment du diagnostic. Cela est aisément expliqué par le fait que les explorations invasives sont peu réalisées chez ces patients asymptomatiques et de bon pronostic. Ces 4 patients étaient atteints de MBL non-LLC. La

lymphocytose médullaire était à la limite supérieure de la normale (20%) dans ces quatre cas sans qu'il n'y ait pour autant d'atypies morphologiques faisant évoquer un diagnostic de maladie de Waldenström ou d'un autre LNH. Le clone B (de même profil que dans le sang) était retrouvé en cytométrie dans 3 cas. Rossi et al. observent d'ailleurs le même pourcentage d'infiltration lymphocytaire sur une série bien plus grande (n=123) [61].

Parmi nos patients, l'un d'entre eux (patient n°15) avait une IgM monoclonale sérique non intégrable au diagnostic, était muté MYD88, avait 16% de lymphocytes médullaires dont 45% de lymphocytes B. A la fin du suivi, l'intégration du pic était estimée à 3.3 g/L et le patient était asymptomatique. Ce cas semble donc remplir les critères d'un « smoldering Waldenström » au vu des critères diagnostiques définis par la Mayo Clinic [27] et de la grande fréquence de la mutation L265P de MYD88 dans la maladie de Waldenström [33,77–79]. De la même manière, les autres patients qui ont une IgM monoclonale sont quasiment tous porteurs de cette mutation de MYD88 et issus du groupe des MBL non-LLC dans 71% (5/7) des cas. Au contraire, les patients du groupe « contrôle » qui ont une IgM ne sont pas mutés. Ces derniers, définis par les mêmes critères que nos patients MBL mais porteurs d'un syndrome tumoral, essentiellement splénique, correspondraient ainsi davantage à des formes indolentes de lymphomes de type lymphome de la zone marginale avec une phase leucémique a minima. Par opposition, on peut donc penser que les MBL non-LLC ayant une IgM s'apparenteraient aux « smoldering Waldenström » et qu'il peut exister un chevauchement entre ces deux entités non formellement définies par l'OMS, ou encore que ces MBL pourraient constituer un état « pré-smoldering Waldenström ». De plus, Varettoni et al. ont montré que la présence de la mutation L265P de MYD88 constituait un facteur prédictif de progression des MGUS à IgM en maladie de Waldenström [81]. Il pourrait donc en être de même avec les MBL à IgM. Ces hypothèses sont à confirmer sur de plus grandes séries incluant le dosage de l'IgM monoclonale en fin de suivi et une exploration médullaire (au mieux histologique) pour chacun des cas. D'autre part, la proportion de MBL ayant une Ig monoclonale sérique et en particulier une IgM n'est pas précisée dans la littérature à notre connaissance et mériterait d'être vérifiée.

## Conclusion

---

La lymphocytose B monoclonale est une entité de découverte assez récente et dont les deux sous-types les moins fréquents ont été très peu étudiés jusqu'ici. Bien que réalisée sur un petit nombre de patients, cette étude montre qu'après un suivi médian de 4 ans les patients atteints ne présentent aucune évolution sur le plan clinique. De plus, sur le plan biologique, deux types de MBL semblent se dessiner selon l'évolution de la lymphocytose. Dans notre étude, pour la moitié des patients la lymphocytose progresse mais sans argument pour une évolution vers une LLC ou un autre LNH B, il pourrait alors s'agir d'une phase leucémique d'un LNH actuellement non classable selon les critères de l'OMS. Et pour plus d'un tiers des patients elle diminue, semblant confirmer la notion de « clone transitoire » décrite dans la littérature.

Du point de vue génétique, la mutation L265P de MYD88, quasi-spécifique de la maladie de Waldenström, a également été retrouvée par une technique de PCR-digestion et de séquençage chez les patients ayant une MBL à IgM. Ces résultats confirment le lien étroit entre la présence d'une IgM monoclonale et la présence de cette mutation. Les MBL non-LLC à IgM pourraient ainsi s'apparenter aux « smoldering Waldenström » ou constituer un état « pré-smoldering Waldenström ».

Il serait intéressant de contrôler ces résultats sur une cohorte de patients bien plus grande, notamment par une étude multicentrique, et de développer une technique de PCR en temps réel plus sensible, en particulier pour les cas trouvés non mutés par la technique employée ici.

## Bibliographie

---

1. Cours-Pharmacie.com. Les cellules immunitaires et les organes lymphoïdes. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/les-cellules-immunitaires-et-les-organes-lymphoïdes.html>. (Page consultée le 01/02/2014)
2. Prin L., Faure G., Carcelain G. Structure et organisation générale du système immunitaire. ASSIM (Association des collègues des enseignants d'immunologie des universités de langue française). [en ligne]. Disponible sur : [http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02\\_files/page82-2.-cellules-et-organes-de-10027immunité.pdf](http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02_files/page82-2.-cellules-et-organes-de-10027immunité.pdf). (Page consultée le 16/02/2014)
3. Lefranc M-P., Lefranc G. Génétique moléculaire des immunoglobulines. IMGT (Immugenetics). [en ligne]. Disponible sur : <http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/index.php?article=IGandBcells&chapter=Genetics&lang=FR&nbr=article>. (Page consultée le 02/02/2014)
4. Batteux F., Garraud O., Prin L., et al. Lymphocytes B : diversité, ontogénèse, différenciation et activation. ASSIM (Association des collègues des enseignants d'immunologie des universités de langue française). [en ligne]. Disponible sur : [http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02\\_files/page82-7.-lymphocytes-b.pdf](http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02_files/page82-7.-lymphocytes-b.pdf). (Page consultée le 16/02/2014)
5. Tanigaki K, Han H, Yamamoto N, Tashiro K, Ikegawa M, Kuroda K, et al. Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol.* mai 2002;3(5):443-450.
6. HAS (Haute Autorité de Santé). Guide affection de longue durée : tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique. Lymphomes non Hodgkiniens de l'adulte. mars 2012;48.
7. Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer.* oct 1974;34(4 Suppl):suppl:1488-1503.
8. Lennert K., Mohri N., Stein H., Kaiserling E. The histopathology of malignant lymphoma. *Br J Haematol.* 1975;31:193-203.
9. Swerdlow SH., Campo E., Harris NL., Jaffe ES., Pileri SA., Vardiman JW. et al. (Eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon : IARC Press. 2008. 439 p.
10. INVS (Institut National de Veille Sanitaire)/CépiDc Inserm. Epidémiologie des cancers en France métropolitaine. 2012.
11. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood.* 1 janv 2006;107(1):265-276.

12. Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Épidémiologie Santé Publique*. juin 2008;56(3):159-175.
14. Hjalgrim H, Engels EA. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. *J Intern Med*. déc 2008;264(6):537-548.
15. Smith MT, Jones RM, Smith AH. Benzene exposure and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. mars 2007;16(3):385-391.
16. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rösen-Wolff A, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*. 1 juill 2001;98(1):194-200.
17. Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F, et al. LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood*. 1 mai 1994;83(9):2423-2427.
18. Hematocell.com. Immunophénotype des syndromes lymphoprolifératifs (SLP). Laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers;
19. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. oct 1994;8(10):1640-1645.
20. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. oct 1997;108(4):378-382.
21. Harris NL, Stein H, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L, et al. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2001;194-220.
22. Oncomip. Référentiel régional de prise en charge. Hématologie. Traitements des lymphomes de l'adulte. 2012.
23. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*. 30 sept 1993;329(14):987-994.
24. Waldenström J. Incipient myelomatosis or « essential » hyperglobulinemia with fibrinogenopenia—a new syndrome ? *Acta Med Scand*. 2009;117:216-247.
25. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML, et al. Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Semin Oncol*. avr 2003;30(2):110-115.

26. Kyle RA, Benson JT, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, et al. Progression in smoldering Waldenstrom macroglobulinemia: long-term results. *Blood*. 10 mai 2012;119(19):4462-4466.
27. Ghobrial IM. Are you sure this is Waldenstrom macroglobulinemia? *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:586-594.
28. 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):564-569.
29. Schop RFJ, Kuehl WM, Van Wier SA, Ahmann GJ, Price-Troska T, Bailey RJ, et al. Waldenström macroglobulinemia neoplastic cells lack immunoglobulin heavy chain locus translocations but have frequent 6q deletions. *Blood*. 15 oct 2002;100(8):2996-3001.
30. Martín-Jiménez P, García-Sanz R, Balanzategui A, Alcoceba M, Ocio E, Sanchez ML, et al. Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenström's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica*. mai 2007;92(5):635-642.
31. Garand R, Sahota SS, Avet-Loiseau H, Talmant P, Robillard N, Moreau A, et al. IgG-secreting lymphoplasmacytoid leukaemia: a B-cell disorder with extensively mutated VH genes undergoing Ig isotype-switching frequently associated with trisomy 12. *Br J Haematol*. avr 2000;109(1):71-80.
32. Berger F, Traverse-Glehen A, Felman P, Callet-Bauchu E, Baseggio L, Gazzo S, et al. Clinicopathologic features of Waldenstrom's macroglobulinemia and marginal zone lymphoma: are they distinct or the same entity? *Clin Lymphoma*. mars 2005;5(4):220-224.
33. Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, Petit B, Marfak A, Rizzo D, et al. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia*. janv 2013;27(1):183-189.
34. Oncocentre. Référentiel de prise en charge des cancers en région Centre. 2013. [En ligne]. Disponible sur : [http://www.oncocentre.org/dcc/ref\\_hemato.htm#ch10](http://www.oncocentre.org/dcc/ref_hemato.htm#ch10) (Page consultée le 21/04/2014)
35. Han T, Ozer H, Gavigan M, Gajera R, Minowada J, Bloom ML, et al. Benign monoclonal B cell lymphocytosis--a benign variant of CLL: clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic studies in 20 patients. *Blood*. juill 1984;64(1):244-252.
36. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 15 juin 2008;111(12):5446-5456.

37. Shanafelt TD, Kay NE, Call TG, Zent CS, Jelinek DF, LaPlant B, et al. MBL or CLL: which classification best categorizes the clinical course of patients with an absolute lymphocyte count  $\geq 5 \times 10^9/L$  but a B-cell lymphocyte count  $< 5 \times 10^9/L$ ? *Leuk Res.* sept 2008;32(9):1458-1461.
38. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, Hillmen P, Houlston RS, Kay N, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.* août 2005;130(3):325-332.
39. Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton JAL, Evans PAS, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of « indolent » chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood.* 15 juill 2002;100(2):635-639.
40. Nieto WG, Almeida J, Romero A, Teodosio C, López A, Henriques AF, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood.* 2 juill 2009;114(1):33-37.
41. Rachel JM, Zucker ML, Fox CM, Plapp FV, Menitove JE, Abbasi F, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis in blood donors. *Br J Haematol.* déc 2007;139(5):832-836.
42. Shim YK, Rachel JM, Ghia P, Boren J, Abbasi F, Dagklis A, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis in healthy blood donors: an unexpectedly common finding. *Blood.* 17 déc 2013;123(9):1319-1326.
43. Te Raa GD, van Oers MH, Kater AP, HOVON CLL working party. Monoclonal B-cell lymphocytosis: recommendations from the Dutch Working Group on CLL for daily practice. *Neth J Med.* juin 2012;70(5):236-241.
44. Vogt RF, Shim YK, Middleton DC, Buffler PA, Campolucci SS, Lybarger JA, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis as a biomarker in environmental health studies. *Br J Haematol.* déc 2007;139(5):690-700.
45. Marti GE, Carter P, Abbasi F, Washington GC, Jain N, Zenger VE, et al. B-cell monoclonal lymphocytosis and B-cell abnormalities in the setting of familial B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* mars 2003;52(1):1-12.
46. Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, Cullen M, Kennedy B, Richards SJ, et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood.* 1 oct 2002;100(7):2289-2290.
47. Goldin LR, Lanasa MC, Slager SL, Cerhan JR, Vachon CM, Strom SS, et al. Common occurrence of monoclonal B-cell lymphocytosis among members of high-risk CLL families. *Br J Haematol.* oct 2010;151(2):152-158.
48. Vardi A, Dagklis A, Scarfò L, Jelinek D, Newton D, Bennett F, et al. Immunogenetics shows that not all MBL are equal: the larger the clone, the more similar to CLL. *Blood.* 30 mai 2013;121(22):4521-4528.

49. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 28 déc 2000;343(26):1910-1916.
50. Fazi C, Scarfò L, Pecciarini L, Cottini F, Dagklis A, Janus A, et al. General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood*. 15 déc 2011;118(25):6618-6625.
51. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton JAL, Plummer M, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 7 août 2008;359(6):575-583.
52. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 1 janv 2007;109(1):259-270.
53. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 15 sept 1999;94(6):1848-1854.
54. Dagklis A, Fazi C, Sala C, Cantarelli V, Scielzo C, Massacane R, et al. The immunoglobulin gene repertoire of low-count chronic lymphocytic leukemia (CLL)-like monoclonal B lymphocytosis is different from CLL: diagnostic implications for clinical monitoring. *Blood*. 2 juill 2009;114(1):26-32.
55. Scarfò L, Zibellini S, Tedeschi A, Maura F, Neri A, Bertazzoni P, et al. Impact of B-cell count and imaging screening in cMBL: any need to revise the current guidelines? *Leukemia*. juill 2012;26(7):1703-1707.
56. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management. *Leukemia*. mars 2010;24(3):512-520.
57. Nieto WG, Teodosio C, López A, Rodríguez-Caballero A, Romero A, Bárcena P, et al. Non-CLL-like monoclonal B-cell lymphocytosis in the general population: prevalence and phenotypic/genetic characteristics. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78 Suppl 1:S24-34.
58. Landgren O, Albitar M, Ma W, Abbasi F, Hayes RB, Ghia P, et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 12 févr 2009;360(7):659-667.
59. Castillo JJ, Dalia S, Pascual SK. Association between red blood cell transfusions and development of non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis of observational studies. *Blood*. 21 oct 2010;116(16):2897-2907.
60. Pavletic SZ, Zhou G, Sobocinski K, Marti G, Doney K, DiPersio J, et al. Genetically identical twin transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. déc 2007;21(12):2452-2455.



61. Rossi D, Sozzi E, Puma A, De Paoli L, Rasi S, Spina V, et al. The prognosis of clinical monoclonal B cell lymphocytosis differs from prognosis of Rai 0 chronic lymphocytic leukaemia and is recapitulated by biological risk factors. *Br J Haematol.* juin 2009;146(1):64-75.
62. Shanafelt TD, Kay NE, Jenkins G, Call TG, Zent CS, Jelinek DF, et al. B-cell count and survival: differentiating chronic lymphocytic leukemia from monoclonal B-cell lymphocytosis based on clinical outcome. *Blood.* 30 avr 2009;113(18):4188-4196.
63. Dilhuydy M. Lymphocytose monoclonale B : une entité complexe. *Correspondances en Onco-Hématologie.* 2013;8(2):72-75.
64. Imler J. Immunité innée et récepteurs Toll. *Actual Néphrologiques.* 2004;
65. Fanfano S. La famille des TLR chez les mammifères. ENS Lyon [En ligne]. Disponible sur : <http://accs.ens-lyon.fr/accs/ressources/immunité-et-vaccination/reponse-immunitaire/comprendre/immunité-innée/famille-des-tlr-chez-les-mammifères-1>. (Page consultée le 10/03/2014)
66. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* janv 2005;17(1):1-14.
67. Von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku C-L, et al. Pyogenic Bacterial Infections in Humans with MyD88 Deficiency. *Science.* 1 août 2008;321(5889):691-696.
68. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.* 4 juin 2009;459(7247):717-721.
69. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.* 3 févr 2011;470(7332):115-119.
70. Choi J-W, Kim Y, Lee J-H, Kim Y-S. MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol.* juill 2013;44(7):1375-1381.
71. Montesinos-Rongen M, Godlewska E, Brunn A, Wiestler OD, Siebert R, Deckert M. Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol (Berl).* déc 2011;122(6):791-792.
72. Pham-Ledard A, Cappellen D, Martinez F, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio J-P. MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol.* août 2012;132(8):2118-2120.
73. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 7 juill 2011;475(7354):101-105.

74. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 29 déc 2011;365(26):2497-2506.
75. Yan Q, Huang Y, Watkins AJ, Kocialkowski S, Zeng N, Hamoudi RA, et al. BCR and TLR signaling pathways are recurrently targeted by genetic changes in splenic marginal zone lymphomas. *Haematologica*. avr 2012;97(4):595-598.
76. Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC, Giraldo P, Mariano Hernández J, Escalante F, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia*. août 2013;27(8):1722-1728.
77. Xu L, Hunter ZR, Yang G, Zhou Y, Cao Y, Liu X, et al. MYD88 L265P in Waldenström macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood*. 14 mars 2013;121(11):2051-2058.
78. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 30 août 2012;367(9):826-833.
79. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, Rattotti S, Riboni R, et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood*. 28 mars 2013;121(13):2522-2528.
80. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Remstein ED, Offord JR, Larson DR, et al. Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 15 nov 2003;102(10):3759-3764.
81. Varettoni M, Zibellini S, Arcaini L, Boveri E, Rattotti S, Pascutto C, et al. MYD88 (L265P) mutation is an independent risk factor for progression in patients with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 26 sept 2013;122(13):2284-2285.
82. Huraux J-M, Nicolas J-C, Agut H, Peigue-Lafeuille H. *Traité de virologie médicale*. Estem. 2003. 699 p.
83. Roche. MagNA Pure LC 2.0 Instrument. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.roche-applied-science.com/shop/products/magna-pure-lc-20-instrument#tab-3> (Page consultée le 19/03/2014)
84. Delarue M., Furelaud G. Le séquençage d'un ADN. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/sequencage/sequence.htm> (Page consultée le 10/05/2014)
85. Mulligan CS, Thomas ME, Mulligan SP. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 6 nov 2008;359(19):2065-2066; author reply 2066.

86. Shim YK, Vogt RF, Middleton D, Abbasi F, Slade B, Lee KY, et al. Prevalence and natural history of monoclonal and polyclonal B-cell lymphocytosis in a residential adult population. *Cytometry B Clin Cytom.* sept 2007;72(5):344-353.
87. Ghia P, Prato G, Scielzo C, Stella S, Geuna M, Guida G, et al. Monoclonal CD5+ and CD5- B-lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly. *Blood.* 15 mars 2004;103(6):2337-2342.
88. Marti GE, Shim YK, Albitar M, Middleton D, Abbasi F, Anderson A, et al. Long-term follow-up of monoclonal B-cell lymphocytosis detected in environmental health studies. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78 Suppl 1:S83-90.

## Annexes

---

### Annexe 1 : Principales études épidémiologiques sur les MBL

Source	Age médian (années)	n	Nombre de couleurs en CMF	Nombre d'évènements analysés ( $\times 10^5$ )	Prévalence des MBL LLC-like	Sexe-ratio (H/F)
<b>Rachel et al. [41]</b> <b>(Population générale)</b>	45	5141	2	NR	0.14%	6
<b>Rawstron et al. [39]</b> <b>(Population générale)</b>	57	910	4	2	3.5%	1.9
<b>Shim et al. [42]</b> <b>(Donneurs de sang)</b>	57	2098	6	50	7.1%	1.9
<b>Nieto et al. [40]</b> <b>(Donneurs de sang)</b>	62	608	8	50	12%	NR

NR : non renseigné

Annexe 2 : Principales caractéristiques des MBL de screening et cliniques comparées à la  
LLC [50,51,63]

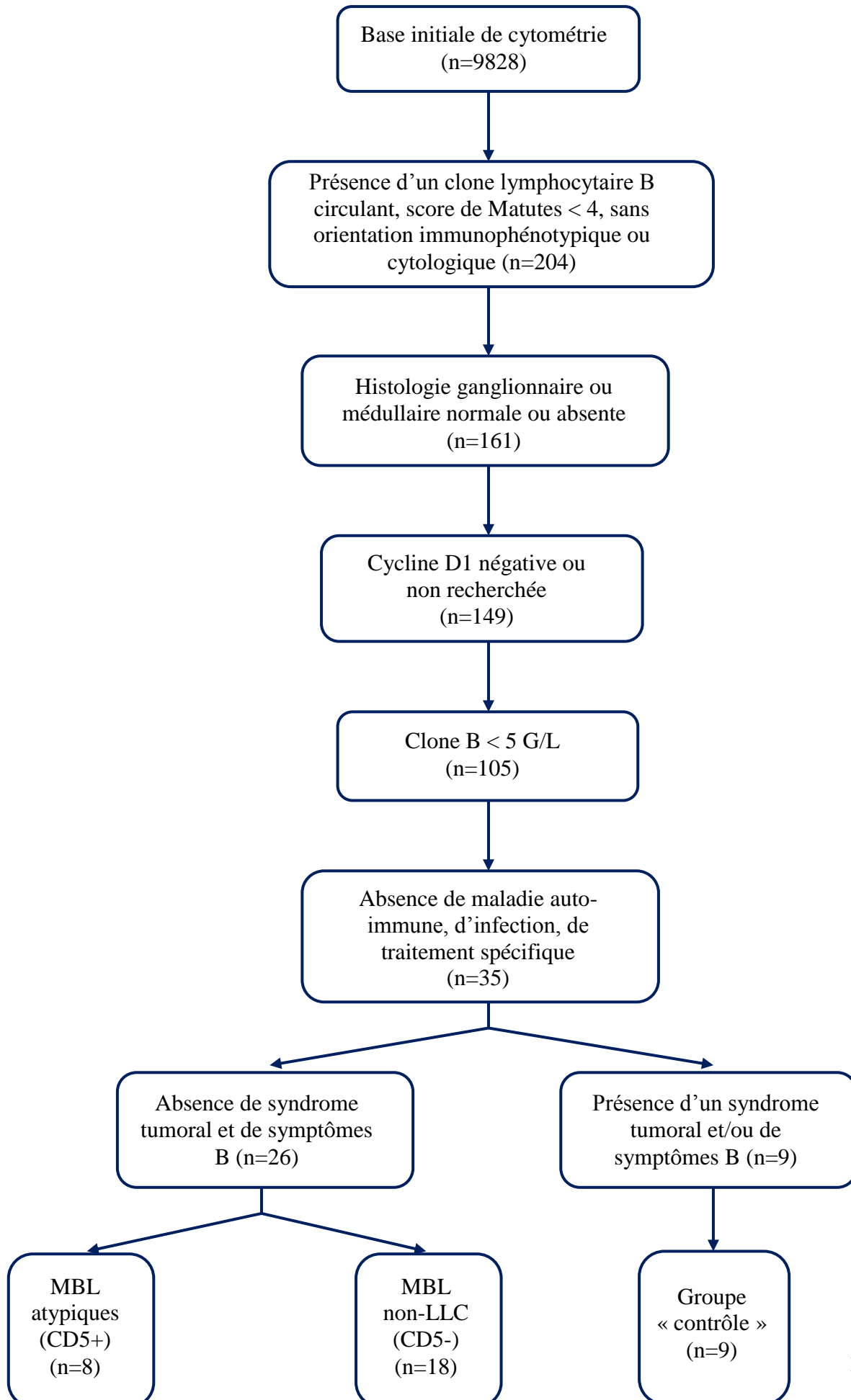
	MBL de screening	MBL cliniques	LLC
<b>Lymphocytes B (valeur absolue)</b>	< 5 G/L	< 5 G/L	> 5 G/L
<b>Clone B (valeur absolue)</b>	< 0.5 G/L (souvent < 0.05 G/L)	> 0.5 G/L (souvent > 1.5 G/L)	NA
<b>Anomalies cytogénétiques</b>			
del 13q14	31.3%	58%	55%
trisomie 12	6.5%	21%	16%
del 11q23	0%	3.6%	18%
del 17p	0%	2.3%	7%
<b>Formes ayant plus de 2% de mutations des IGHV</b>	70 à 88%	90%	58%
<b>Gènes IGHV les plus utilisés</b>	IGHV 4-59 et IGHV 4-61	IGHV 4-59 et IGHV 4-61	IGHV 4-34 et IGHV 1-69
<b>Progression vers une LLC</b>	Rarissime	1.1 %/an	NA
<b>Suivi</b>	Non conseillé	Annuel	Se référer aux recommandations de l'IWCLL

NA : non applicable

Annexe 3 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 dans les principaux LNH B

	Fréquence	Etude
<b>LBDGC</b>		
Type ABC	29%	Ngo et al.
Type GCB	Rare	Ngo et al.
Type PMBL	0%	Ngo et al.
<b>Lymphome de Burkitt</b>	0%	Ngo et al.
<b>LLC</b>	2.9%	Puente et al.
<b>MZL</b>		
SMZL	13% / 21% / 10% / 7% / 6%	Yan et al. / Jimenez et al. / Xu et al. / Treon et al. / Varettoni et al.
NMZL	0%	Gachard et al.
MALT	7% / 9%	Gachard et al. / Ngo et al.
<b>MW</b>	91% / 100% / 93% / 67%	Treon et al. / Varettoni et al. / Xu et al. / Gachard et al.
<b>MGUS à IgM</b>	10% / 47% / 54%	Treon et al. / Varettoni et al. / Xu et al.
<b>Myélome (dont à IgM)</b>	0%	Treon et al.
<b>Témoins sains</b>	0%	Treon et al.

Annexe 4 : Critères de sélection appliqués lors du recueil de données



Annexe 5 : Panel « orientation B »

	FC500			Navios	
	Antigène cible	Fluorochrome		Antigène cible	Fluorochrome
<b>Tube 1</b>	CD45	PC7	<b>Tube 1</b>	CD45	KO
	CD2	FITC		CD2	PC7
	CD19	PE		CD3	APC-Alexa 750
	CD5	PC5		CD4	ECD
<b>Tube 2</b>	CD45	PC7		CD8	APC-Alexa 700
	CD3	PC5		CD19	PC5.5
	CD4	PE		CD20	PB
	CD8	FITC		Kappa	FITC
<b>Tube 3</b>	CD45	PC7		Lambda	PE
	CD19	PC5		CD5	APC
	Kappa	FITC			
	Lambda	PE			



Annexe 6 : Panel « complément B »

	FC500			Navios	
	Antigène cible	Fluorochrome		Antigène cible	Fluorochrome
<b>Tube 1</b>	FMC7	FITC	<b>Tube 1</b>	FMC7	FITC
	CD79b	PE		CD79b	APC
	CD19	PC5		CD19	ECD
	CD38	PC7		CD38	PC5.5
<b>Tube 2</b>	IgD	FITC		CD25	PB
	CD23	PE		CD23	APC-Alexa 700
	CD20	PC5		CD10	PE
	CD19	PC7		CD43	APC-Alexa 750
<b>Tube 3</b>	CD25	FITC		CD45	KO
	CD11c	PE		CD11c	PC7
	CD19	PC5			
	CD45	PC7			
<b>Tube 4</b>	CD43	FITC			
	CD10	PE			
	CD19	PC5			
	CD45	PC7			

Annexe 7 : Caractéristiques clinico-biologiques des patients atteints de MBL inclus dans l'étude (1/3)

N° d'anonymat des patients	Sexe	Age au diagnostic	Service	Hb au diagnostic (g/dL)	Hb en fin de suivi (g/dL)	Plaquettes au diagnostic (G/L)	Plaquettes en fin de suivi (G/L)	PNN au diagnostic (G/L)	PNN en fin de suivi (G/L)	LDH au diagnostic (UI/L)	β2m au diagnostic (mg/L)
1	H	87	Neurologie	11	13,3	195	160	1,01	5,06	190	3,24
2	H	80	Médecine de suite	8,9	14,9	306	144	3,95	4	324	2,29
3	H	50	Hématologie	13,9	14,3	310	238	6,68	3,5	313	1,8
4	H	56	Hématologie	14,3	14,4	367	390	3,3	3,6	415	NR
5	F	68	Hématologie	14,8	12,7	229	164	3,2	2,4	364	NR
6	H	83	Hématologie	14,8	13,2	279	289	3,8	4,1	400	3,1
7	H	84	Hématologie	14,8	15,1	263	147	4,8	3,9	388	2,8
8	F	78	Pneumologie	13,4	13,9	227	352	5,1	7	334	2,5
9	F	70	Hématologie	14,5	12,5	189	160	7,3	4	452	NR
10	H	73	Hématologie	11,4	10	238	115	2,7	8,9	NR	NR
11	H	50	Hématologie	14,6	14,9	270	188	4,5	5,6	NR	NR
12	F	75	Polyclinique	13,5	11,1	209	386	4,9	4,33	NR	NR
13	F	82	Hématologie	13,2	10,5	384	316	5,6	6,16	273	NR
14	F	71	Endocrinologie	13,5	11,8	265	236	3	8,3	NR	NR
15	H	59	Hématologie	15	12,9	359	310	5	5,3	442	1,7
16	H	83	Hématologie	13,8	12,2	187	140	7,6	4,7	251	3,13
17	F	73	Hématologie	13,2	NR	192	NR	4,4	4,8	492	NR
18	H	65	Hématologie	15,3	14,5	196	163	2,9	2,8	153	NR
19	F	61	Médecine interne	13,2	13,9	253	247	3,2	4,5	219	1,99
20	H	74	Hématologie	14,7	14,1	162	178	3,6	3,2	386	NR
21	F	67	Hématologie	14,4	13	336	257	8,4	2,9	378	2,27
22	F	86	Hématologie	14,5	14,2	169	141	5,2	5,2	286	2,87
23	F	63	Médecine interne	NR	NR	NR	NR	6,21	NR	NR	NR
24	F	89	Gériatrie	10,5	11,6	294	277	6,9	4	342	NR
25	H	77	Cardiologie	14,2	15,6	177	162	5,8	3,8	182	NR
26	H	82	Hématologie	14,2	8,8	200	493	5,1	11,2	NR	2,7

NR : non renseigné

Annexe 7 (suite) : Caractéristiques clinico-biologiques des patients atteints de MBL inclus dans l'étude (2/3)

N° anonymat des patients	Lymphocytose totale au diagnostic (G/L)	Lymphocytose T au diagnostic (G/L)	Ratio CD4/CD8	Lymphocytose B au diagnostic (G/L)	CD5	CD23	Expression de l'Ig de surface	FMC7	Intensité du CD79b	Chaîne légère du clone B	Score de Matutes	Taux de mutations des IGHV	Caryotype
1	2,05	1,15	1,0	0,76	+	+	moyen	+	fort	kappa	2	NF	NF
2	3,24	1,39	4,2	1,62	+	+	forte	+	moyen	kappa	3	NF	NF
3	5,29	3,28	1,4	1,80	+	+	moyen	-	faible	kappa	3	NF	normal
4	5,43	2,82	1,2	2,39	+	-	faible	+	moyen	kappa	3	NF	NF
5	10	3,40	1,0	4,80	+	-	forte	+	moyen	lambda	1	NF	NF
6	5,8	2,03	6,2	3,13	+	-	forte	+	faible	lambda	2	NF	NF
7	8,68	3,73	2,0	4,08	+	-	forte	-	moyen	kappa	2	NF	NF
8	6,5	3,45	8,0	1,11	+	-	forte	+	NF	kappa	1	NF	NF
9	5,07	4,06	11,3	0,51	-	+	moyen	+	NF	kappa	1	NF	NF
10	3,58	1,61	5,8	0,54	-	-	moyen	-	moyen	kappa	1	NF	NF
11	5,89	2,77	10,0	0,65	-	+	moyen	+	NF	kappa	2	NF	NF
12	5,01	1,25	3,5	0,65	-	-	moyen	+	moyen	kappa	1	NF	NF
13	3,27	2,29	3,6	0,72	-	-	forte	+	moyen	kappa	0	NF	NF
14	6,14	2,46	4,8	0,80	-	-	forte	+	moyen	kappa	0	NF	NF
15	1,93	0,83	2,2	0,87	-	-	forte	-	fort	kappa	1	NF	NF
16	2,51	1,36	0,0	1,00	-	-	moyen	+	moyen	kappa	0	NF	NF
17	4,05	2,67	1,1	1,01	-	+	forte	+	fort	kappa	1	NF	NF
18	5,19	3,11	1,2	1,76	-	-	moyen	+	faible	kappa	1	NF	NF
19	5,06	2,88	2,6	1,82	-	-	moyen	+	faible	kappa	0	NF	NF
20	5,02	1,56	1,8	3,11	-	-	forte	-	moyen	kappa	1	NF	NF
21	6,52	2,48	4,5	3,33	-	-	forte	+	moyen	kappa	1	>2%	isochromosome 17
22	6,05	2,54	2,1	3,33	-	-	moyen	+	NF	lambda	1	NF	NF
23	5,67	1,93	2,3	3,40	-	-	forte	+	fort	kappa	0	NF	NF
24	5,18	1,30	3,2	3,73	-	-	forte	+	fort	lambda	0	NF	NF
25	6,82	1,84	1,0	4,71	-	-	forte	+	moyen	kappa	0	NF	NF
26	4,79	1,39	1,9	1,91	-	-	forte	+	moyen	kappa	0	NF	NF

NF : non fait

Annexe 7 (suite) : Caractéristiques clinico-biologiques des patients atteints de MBL inclus dans l'étude (3/3)

N° d'anonymat des patients	Statut du gène MYD88	Présence d'une immunoglobuline monoclonale	Taux de l'Ig monoclonale au diagnostic (g/L)	Taux de l'Ig monoclonale en fin de suivi (g/L)	IgG au diagnostic (g/L)	IgA au diagnostic (g/L)	IgM au diagnostic (g/L)	Lymphocytose totale en fin suivi (G/L)	Variation de la lymphocytose entre la fin du suivi et le diagnostic (G/L)	Taux d'accroissement des lymphocytes (G/L/an)	Evolution clinique	Durée de suivi (mois)
1	NF	Mλ	NI	NR	5,77	0,7	1,33	2,61	0,56	0,34	aucune	20
2	sauvage muté	non	NA	NA	5,2	0,71	0,2	5	1,76	0,48	aucune	44
3	L265P muté	Mκ	7	NR	10,8	1,67	10,1	6,4	1,11	0,37	aucune	36
4	L265P	Gκ	NI	NR	10,1	1,15	0,7	7,3	1,87	0,86	aucune	26
5	sauvage	non	NA	NA	9,9	1,4	1,1	15,1	5,1	1,06	aucune	58
6	sauvage	non	NA	NA	7	1,1	0,28	4,7	-1,1	-0,49	aucune	27
7	sauvage	non	NA	NA	NR	NR	NR	5	-3,68	-2,01	aucune	22
8	sauvage	Gκ	NI	NR	11,3	1,4	0,9	5	-1,5	-0,31	décès	58
9	sauvage	non	NA	NA	NR	NR	NR	2,7	-2,37	-0,31	aucune	93
10	sauvage	non	NA	NA	NR	NR	NR	2	-1,58	-0,22	décès	87
11	sauvage	non	NA	NA	NR	NR	NR	8,62	2,73	0,37	aucune	89
12	NF muté	non	NA	NA	NR	NR	NR	5,74	0,73	0,10	aucune	87
13	L265P	Mκ	11,8	NR	NR	NR	NR	4,02	0,75	0,15	aucune	61
14	sauvage muté	non	NA	NA	7,5	1,25	1,29	9,29	3,15	0,43	aucune	88
15	L265P	Mκ	NI	3,3	8,8	0,9	13,7	1,7	-0,23	-0,06	aucune	50
16	NF muté	non	NA	NA	12,2	2,1	0,87	3,63	1,12	0,56	aucune	24
17	L265P	Mκ	NI	3,9	12	1,38	16,9	8,4	4,35	0,78	aucune	67
18	sauvage	non	NA	NA	NR	NR	NR	3,8	-1,39	-0,70	aucune	24
19	sauvage	non	NA	NA	NR	NR	NR	4,9	-0,16	-0,04	aucune	45
20	sauvage muté	non	NA	NA	NR	NR	NR	4,9	-0,16	-0,04	aucune	45
20	L265P	Mκ	7,8	9,4	7,3	0,7	11,9	4,22	-0,8	-0,13	aucune	73
21	sauvage	non	NA	NA	8,9	1,46	0,5	8,4	1,88	0,40	aucune	56
22	sauvage	Gλ	NI	NR	8,9	2,1	0,4	7,8	1,75	0,88	aucune	24
23	sauvage	non	NA	NA	9,7	3,1	0,5	6	0,33	0,05	aucune	86
24	sauvage	non	NA	NA	NR	NR	NR	3,9	-1,28	-2,56	aucune	6
25	sauvage	non	NA	NA	NR	NR	NR	6,5	-0,32	-0,35	aucune	11
26	sauvage	Mλ	NI	NR	8,2	1,2	2,1	2,07	-2,72	-0,69	aucune	47

NR : non renseigné, NI : non intégrable, NA : non applicable, NF : non fait

## Table des matières

---

<b>Remerciements</b> .....	<b>4</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>7</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>12</b>
<b>Première partie : généralités</b> .....	<b>13</b>
I. Lymphopoïèse et immunopoïèse B normales .....	13
A. Organes lymphoïdes .....	13
1. Organes lymphoïdes primaires .....	13
2. Organes lymphoïdes secondaires .....	14
a. Les ganglions lymphatiques .....	14
b. La pulpe blanche de la rate .....	17
c. Tissu lymphoïde associé aux muqueuses .....	17
B. Lymphopoïèse B .....	17
1. Différenciation et maturation intra-médullaires des lymphocytes B .....	18
a. Le BCR, récepteur des lymphocytes B pour l'antigène .....	18
b. Ontogénèse intra-médullaire des lymphocytes B .....	22
2. Etapes post-médullaires dépendantes de l'antigène .....	23
a. Différenciation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires	23
b. Modifications du BCR après contact avec l'antigène .....	23
II. Lymphomes non Hodgkiniens B et lymphocytose B monoclonale .....	25
A. Lymphomes non Hodgkiniens B .....	25
1. Classification des LNH B .....	25
2. Epidémiologie des LNH .....	27
3. Facteurs de risque .....	30
4. Physiopathologie .....	30
a. Exemple d'un LNH indolent : le lymphome folliculaire .....	32
b. Exemple d'un LNH agressif : le lymphome B diffus à grandes cellules .....	32
5. Diagnostic et bilan initial .....	33
a. Examen clinique .....	33
b. Biologie .....	33
c. Anatomopathologie .....	40
d. Bilan d'extension .....	40
e. Bilan pré-thérapeutique .....	42
6. Pronostic .....	43
a. LNH agressifs .....	43
b. LNH indolents .....	44
B. Le lymphome lymphoplasmocytaire / la maladie de Waldenström .....	44
1. Définition et classification .....	44
2. Epidémiologie .....	46
3. Signes cliniques .....	46

4.	Diagnostic.....	47
5.	Anomalies cytogénétiques et statut mutationnel des IGHV .....	48
6.	Diagnostic différentiel .....	48
7.	Pronostic et traitement.....	50
C.	Lymphocytose B monoclonale (MBL) .....	50
1.	Historique .....	50
2.	Critères diagnostiques et classification .....	51
3.	Epidémiologie .....	53
a.	Prévalence dans la population générale.....	53
b.	Prévalence chez les sujets exposés aux déchets toxiques .....	55
c.	Prévalence dans les formes familiales de LLC .....	55
4.	Caractéristiques biologiques des MBL .....	56
a.	Taille du clone lymphocytaire B .....	56
b.	Anomalies cytogénétiques.....	56
c.	Mutations des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines.....	57
5.	Evolution .....	58
a.	MBL de screening .....	58
b.	MBL cliniques .....	59
c.	Transfusions sanguines et MBL.....	60
6.	Facteurs pronostiques .....	60
7.	Surveillance .....	61
III.	Mutations de MYD88 et LNH B.....	62
A.	Immunité innée et TLR .....	62
1.	Structure et ligands des récepteurs Toll .....	62
2.	Voies de signalisation activées par les TLR.....	64
B.	Implications de la mutation L265P de MYD88 dans les LNH B.....	66
1.	Lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL).....	66
2.	Leucémie lymphoïde chronique (LLC).....	68
3.	Lymphomes de la zone marginale (MZL).....	68
4.	MGUS et maladie de Waldenström/lymphome lymphoplasmocytaire.....	68
IV.	Principes généraux de biologie moléculaire : la PCR et le séquençage.....	71
A.	Etape d'extraction de l'ADN.....	71
1.	Extraction manuelle.....	71
2.	Extraction automatique.....	72
B.	Principes de la PCR conventionnelle .....	72
C.	Principes du séquençage selon la méthode de Sanger.....	75
<b>Deuxième partie : Etude rétrospective de la mutation L265P de MYD88 et du suivi de 26 cas de lymphocytose B monoclonale au CHU de Limoges entre 2005 et 2012.....</b>		<b>77</b>
I.	Matériels et méthodes.....	77
A.	Sélection des données et des patients .....	77
B.	Etudes de biologie moléculaire .....	80
1.	Technique de PCR-digestion.....	80
a.	Préparation du mix PCR.....	80
b.	Amplification .....	81
c.	Digestion de l'amplicon .....	81
d.	Migration .....	82
e.	Interprétation .....	82
2.	Technique de séquençage.....	83

a.	PCR initiale .....	83
b.	Purification des produits de PCR .....	83
c.	PCR de séquençage .....	83
d.	Purification du produit de séquençage .....	83
e.	Passage au séquenceur .....	84
C.	Traitement statistique des données.....	84
II.	Résultats .....	85
A.	Caractéristiques des MBL atypiques et non-LLC au diagnostic.....	85
B.	Caractéristiques des MBL atypiques et non-LLC à la fin du suivi .....	89
C.	Caractéristiques des MBL porteuses de la mutation L265P de MYD88 .....	92
1.	Au diagnostic.....	93
2.	A la fin du suivi.....	98
D.	Caractéristiques des MBL ayant une IgM monoclonale sérique ou non.....	100
1.	Au diagnostic.....	101
2.	A la fin du suivi.....	101
III.	Discussion .....	102
	<b>Conclusion.....</b>	<b>107</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>108</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>116</b>
	<b>Table des matières .....</b>	<b>125</b>
	<b>Table des illustrations .....</b>	<b>128</b>
	<b>Table des tableaux.....</b>	<b>130</b>

## Table des illustrations

---

Figure 1 : Schéma d'un ganglion lymphatique .....	15
Figure 2 : Structure du BCR.....	18
Figure 3 : Organisation des gènes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines.....	19
Figure 4 : Recombinaison VDJ des gènes des chaînes lourdes.....	21
Figure 5 : Mécanisme de commutation isotypique : exemple de la synthèse d'IgE .....	24
Figure 6 : Etapes de la maturation des lymphocytes dans le ganglion.....	24
Figure 7 : Classification OMS 2008 des LNH B .....	26
Figure 8 : Taux d'incidence des LNH B entre 2008 et 2010 et par région.....	27
Figure 9 : Evolution de l'incidence et de la mortalité des LNH B entre 1980 et 2005.....	28
Figure 10 : Evolution de l'incidence et de la mortalité des LNH B en fonction de l'âge .....	28
Figure 11 : Fréquences relatives des différentes formes de LNH B .....	29
Figure 12 : Relations entre les différents stades de la différenciation lymphocytaire B et les principaux lymphomes non hodgkiniens.....	31
Figure 13 : Lymphocytes de LLC et ombre de Gumprecht .....	35
Figure 14 : Lymphome folliculaire .....	35
Figure 15 : Lymphome du manteau .....	36
Figure 16 : Leucémie à prolymphocytes .....	36
Figure 17 : Lymphome de la zone marginale splénique à lymphocytes villeux .....	37
Figure 18 : Lymphome de la zone marginale splénique : cellule monocytoïde et lymphoplasmocyte .....	37
Figure 19 : Lymphome de Burkitt.....	37
Figure 20 : Maladie de Waldenström : lymphoplasmocyte et plasmocytes.....	47
Figure 21 : Structures des TLR et IL-1R.....	63
Figure 22 : Les différents TLR et leurs ligands.....	64
Figure 23 : Voies de signalisation des TLR .....	66
Figure 24 : Principe de l'extraction automatique par le MagNA Pure® Compact.....	72
Figure 25 : Etapes de la réaction de PCR.....	74
Figure 26 : Principe de la technique d'amplification en chaîne par polymérase ou PCR .....	74
Figure 27 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger, exemple avec le ddGTP ....	76
Figure 28 : Exemple de résultat de séquençage par un séquenceur automatique.....	76
Figure 29 : Interprétations des profils obtenus après migration sur gel pour une série de patients .....	82
Figure 30 : Séquence d'un patient muté L265P avec l'amorce sens MYD88-Ex5-F1 .....	84
Figure 31 : Séquence d'un patient muté L265P avec l'amorce antisens MYD88-Ex5-R1.....	84
Figure 32 : Evolution de la lymphocytose totale à la fin du suivi des 26 cas de MBL.....	91
Figure 33 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 parmi les patients ayant une immunoglobuline monoclonale sérique de type IgG et IgM .....	94
Figure 34 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 parmi l'ensemble des MBL (n=23) et isotypes des immunoglobulines monoclonales .....	95
Figure 35 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 parmi les MBL non-LLC (n=16) et isotype de l'immunoglobuline monoclonale.....	95
Figure 36 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 parmi les MBL atypiques (n=7) et isotypes des immunoglobulines monoclonales .....	95
Figure 37 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 parmi les MBL dont la lymphocytose a progressé à la fin du suivi (n=10).....	99



Figure 38 : Fréquence de la mutation L265P de MYD88 parmi les MBL dont la lymphocytose a diminué ou est restée stable à la fin du suivi (n=13) ..... 99

## Table des tableaux

---

Tableau 1 : Caractéristiques immunophénotypiques des principaux LNH B .....	38
Tableau 2 : Score de Matutes .....	39
Tableau 3 : Principales translocations dans les LNH B .....	40
Tableau 4 : Classification d'Ann Arbor .....	41
Tableau 5: Index Prognostic International (IPI).....	43
Tableau 6 : Survie moyenne selon le groupe pronostic tous âges confondus .....	43
Tableau 7: Exemples d'index pronostics pour les lymphomes folliculaires .....	44
Tableau 8 : Classification de la maladie de Waldenström et des MGUS à IgM.....	45
Tableau 9 : Critères diagnostiques de la maladie de Waldenström.....	48
Tableau 10 : Critères diagnostiques et classification des MBL .....	53
Tableau 11 : Amorces utilisées pour l'amplification de l'exon 5 du gène MYD88.....	80
Tableau 12 : Etape d'amplification sur les thermocycleurs.....	81
Tableau 13 : Principales caractéristiques démographiques des patients inclus.....	85
Tableau 14 : Caractéristiques biologiques au diagnostic des patients atteints de MBL .....	88
Tableau 15 : Comparaison des paramètres biologiques des deux groupes de MBL au diagnostic et à la fin de suivi .....	90
Tableau 16 : Caractéristiques clinico-biologiques en fin de suivi des patients atteints de MBL .....	92
Tableau 17 : Statut mutationnel de MYD88 en fonction des MBL .....	93
Tableau 18 : Principales caractéristiques biologiques des MBL en fonction du statut mutationnel de MYD88 au diagnostic.....	97
Tableau 19 : Principales caractéristiques biologiques des MBL en fonction du statut mutationnel de MYD88 à la fin du suivi.....	100

## SERMENT DE GALIEN

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

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

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

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

**Nicolas LECHEVALIER**

**Etude rétrospective de la mutation L625P de MYD88 et du suivi de 26 cas de lymphocytose B monoclonale au CHU de Limoges entre 2005 et 2012.**

**Résumé :**

La lymphocytose B monoclonale (MBL) est une entité récemment décrite dont les critères diagnostiques ont été définis en 2005. La très grande majorité des publications concernent les MBL LLC-like, sous-type le plus fréquent et susceptible d'évoluer dans de rares cas vers une leucémie lymphoïde chronique (LLC). En revanche, les modes d'évolution et les mécanismes génétiques à l'origine des MBL atypiques et non-LLC restent à l'heure actuelle peu connus. Parallèlement, le séquençage du génome de patients atteints de lymphomes non-Hodgkiniens B (LNH B) a mis en évidence la mutation L265P de MYD88, une protéine adaptatrice de la voie des Toll-like Receptor. Bien que présente dans un faible pourcentage de LNH B, elle est quasi-spécifique de la maladie de Waldenström.

Nous rapportons dans 26 cas de MBL atypiques et non-LLC le suivi clinique et biologique à moyen terme et la fréquence de la mutation de MYD88 par une technique de PCR-digestion confirmée par séquençage. Après un suivi médian de 4 ans, il n'y avait aucune évolution clinique, même pour la moitié des cas où la lymphocytose progressait et pour lesquels il n'existait aucun argument pour une évolution vers un LNH ou une LLC. Pour un tiers des patients, la lymphocytose diminuait, semblant confirmer la notion de « clone transitoire » décrite dans la littérature. La mutation L265P a été retrouvée quasi-uniquement chez les patients ayant une MBL à IgM, en particulier de type non-LLC. Ces cas suggèrent un possible chevauchement entre les MBL non-LLC à IgM et les « smoldering Waldenström », deux entités non officiellement définies par l'OMS.

**Mots-clés :** Lymphocytose B monoclonale, MYD88, MBL atypique, MBL non-LLC.

**Abstract :**

Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) is a recently described entity whose diagnostic criteria were defined in 2005. Most of publications are related to CLL-like MBL, the most frequent MBL subgroup and liable to progress to a chronic lymphocytic leukemia (CLL) in rare cases. However, the evolution and the genetical mechanisms underlying atypical and non-CLL MBL remain unknown. In parallel, the sequencing of patient's genome affected by B-cell non-Hodgkin Lymphomas (B-cell NHL) highlighted the L265P mutation of MYD88, an adaptatrice protein of the Toll-like Receptor's way. Although present in a low percentage of B-cell NHL, it is almost specific of the Waldenström's disease.

We report the results of 26 atypical and non-CLL MBL for the medium-term clinical and biological follow-up and the frequency of MYD88 L265P mutation by a PCR-digestion method confirmed by sequencing. After a 4 years median follow-up, there was no clinical progression, even for half of the cases where the lymphocytosis progressed and for whom there was no argument for an evolution towards a NHL or a CLL. For a third of the patients, the lymphocytosis decreased, in agreement with the notion of « transitionnal clone » described in the literature. The L265P mutation was found almost only in IgM-MBL, especially in the non-CLL subgroup. These cases suggest a possible overlapping between IgM-MBL and « smoldering Waldenström », two entities not officially defined by the WHO.

**Keywords :** Monoclonal B-cell lymphocytosis, MYD88, atypical MBL, non-LLC MBL.