

Faculté de Pharmacie

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 4 octobre 2019

Par

Mylène Gayet

Né(e) le 31 juillet 1991 à Clermont-Ferrand

Macroglobulinémie de Waldenström : intérêt diagnostique du double immunophénotypage lymphocytaire et plasmocytaire et exploration du statut mutationnel des gènes *MYD88* et *CXCR4*

Thèse dirigée par M. le Docteur David RIZZO

Examineurs :

M^{me}. le Professeur Sylvie Rogez.....Présidente

M. le Professeur Arnaud Jaccard.....Juge

M. le Professeur Jean Feuillard.....Juge

M^{me}. le Docteur Jasmine Chauzeix.....Juge

M^{me}. le Docteur Anne-Françoise Sapin.....Membre invité



Faculté de Pharmacie

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 4 octobre 2019

Par Mylène Gayet

Né(e) le 31 juillet 1991 à Clermont-Ferrand

Macroglobulinémie de Waldenström : intérêt diagnostique du double immunophénotypage lymphocytaire et plasmocytaire et exploration du statut mutationnel des gènes *MYD88* et *CXCR4*

Thèse dirigée par M. le Docteur David RIZZO

Examineurs :

M^{me}. le Professeur Sylvie Rogez.....Présidente
M. le Professeur Arnaud Jaccard.....Juge
M. le Professeur Jean Feuillard.....Juge
M^{me}. le Docteur Jasmine Chauzeix.....Juge
M^{me}. le Docteur Anne-Françoise Sapin.....Membre invité



Liste des enseignants

Le 1^{er} novembre 2018

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HÉMATOLOGIE (du 01.11.2018 au 31.10.2019)
JOST Jérémy	PHARMACIE CLINIQUE (du 01.11.2018 au 31.10.2019)

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE

BÉGAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTRÔLE DU MÉDICAMENT
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLÉDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FABRE Gabin	SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET INGÉNIERIE APPLIQUÉE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LAVERDET-POUCH Betty	PHARMACIE GALÉNIQUE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE (jusqu'au 31.01.2019)
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALÉNIQUE – BIOMATÉRIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

BOUDOT Clotilde

MICROBIOLOGIE
(du 01.09.2018 au 31.08.2019)

RIOUX Benjamin

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
(du 01.09.2018 au 31.08.2019)

PROFESSEUR CERTIFIÉ

VERCELLIN Karen

ANGLAIS

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques

(jusqu'au 30.09.2019)

DREYFUSS Gilles

(jusqu'au 30.09.2019)

MOESCH Christian

(jusqu'au 01.01.2019)

Remerciements

A Madame le Professeur Sylvie Rogez,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Merci pour vos enseignements lors de mon passage dans le service de Virologie. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Arnaud Jaccard,

Vous me faites l'honneur d'apporter votre expérience à la critique de ce travail. Je vous prie de bien vouloir accepter ma respectueuse considération.

A Monsieur le Professeur Jean Feuillard,

Je vous remercie pour votre encadrement au cours de cette thèse et de mon internat. Merci également pour votre bienveillance, votre disponibilité et votre sympathie. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Jasmine Chauzeix,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail, je suis ravie de t'offrir ta première place en tant que membre du jury de thèse. Je te remercie pour ton soutien et ta gentillesse.

A Madame le Docteur Anne-Françoise Sapin,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de venir de Clermont-Ferrand, où tout a commencé. Merci pour vos enseignements à la faculté qui m'ont donné le goût de l'hématologie et votre soutien qui m'a permis de me lancer dans cette folle aventure qu'est l'internat.

A Monsieur le Docteur David Rizzo,

Merci pour tout, ta patience, ta pédagogie et tes lumières. Je te remercie pour ta bonne humeur qui a rendu ce travail si facile, puisses-tu y trouver le témoignage de mon profond respect.

A tous ceux qui m'ont apporté leur aide dans la réalisation de ce travail, merci,

A Vincent, avec qui ce travail a commencé, merci pour ton savoir et ta sympathie.

A Adélaïde, Marie-Pierre et Mélanie pour votre aide précieuse pendant mes manip en biologie moléculaire et votre gentillesse.

A Anne, Patricia et Stéphane pour m'avoir laissé squatter dans vos quartiers et pris le temps de répondre à toutes mes questions.

A Valentin et Paco pour l'analyse bio-informatique, je vous respecte autant que je ne comprends rien à ce que vous faites.

A Alexis, pour le partage de ton expérience lors du lancement du projet CXCR4.

A Estelle, Nathalie et Franck, pour m'avoir apporté votre expertise tout au long de ce travail.

A Virginie et Nina, pour m'avoir apporté tous ces cafés pendant la rédaction du manuscrit.

A tous ceux qui ont fait de moi l'interne que je suis aujourd'hui, merci pour tous vos enseignements, votre patience, votre gentillesse. J'ai appris de tous et j'emmène avec moi un excellent souvenir de mon passage à Limoges.

A Jérôme, mon papa au laboratoire sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour ta confiance et tes enseignements.

A mes sportifs du dimanche, toujours prêt à venir patauger dans la boue avec moi : Sylvain, Catalina, Maxime, Yohan, Guigui, Rémy et Marie.

A Marie-Fleur et Marine, mes amies, tendres souvenirs de ce fabuleux voyage écossais. J'espère vous revoir vite les mamans-CDP.

A tous mes cointernes : Virginie, Nina, Léa, Caroline, Malika, Guillaume, Nicolas, Marine, Marie-Fleur, Rémy, Cassandra, Sarah N., Robin, François, Mouaffek, Sarah M., Benjamin, Etienne, Wasfi, Pauline, Marc, Ali, Théo, Sébastien, Charlotte R., Thibaut, Claudia, Charly, Sophie, Charlotte F. Claire, Blandine, Sammara, Marie-Céleste, Audrey, Camille, Jessica, Stéphanie, Josselin et ceux que j'oublie.

A mes copains de fac, je clos ce chapitre en passant la dernière. J'espère vous revoir chaque année dans un gîte par temps de pluie : Charlotte, Laureline, Emilie, Floriane, Laurence, Greg, Bichon et les pièces rapportées qu'on aime bien quand même Florian, Loïc, Clément et Noémie.

A Catherine, ma meilleure amie depuis le jour où je t'ai choisie dans mon équipe au CP. J'espère qu'Oxana est fière de sa marraine. A Cédric, le papa poule.

Aux copains, Pépito, Marion, Clément, Marine C., Manon, Elvina, Marion, Marine S., et Claudie.

A Doudou, je s'appelle Groot.

A ma belle-famille et à Chichi, toujours présents qu'importe la place, qu'importe l'endroit.

A Amandine, Mathieu et mon Belou. Merci pour tous ces fous rires.

A ma famille, merci de faire partie de ma vie. Lucie, Djé, Soline, Paquinette, Chris et Zouzou.

A mes grands-parents, vous m'avez porté jusqu'ici. Je tourne cette page sans vous. Papy-doux et Maminette, vous me manquerez tous les jours du reste de ma vie.

A mes parents, qui ne pensaient peut-être pas m'avoir sur le dos si longtemps, ça y est Papouni et Timoumou, l'école c'est fini. Merci pour votre amour, votre foi inébranlable en moi et votre soutien indispensable. Je vous aime.

A ma Zet', ma vie, mon tout. Merci pour ton soutien sans faille, ta joie de vivre, ta présence, ton amour, ton « *mézémarzel!* » ... tellement de choses que je pourrais en écrire une thèse (mais là non, ça suffit). Je t'aime.

A Florian, merci d'être à mes côtés depuis les bancs de la fac. En route pour une nouvelle aventure à Roanne. « Je suis complètement amoureuse de toi ».

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Liste des abréviations.....	18
I. Introduction	21
I.1. La Macroglobulinémie de Waldenström	21
I.1.1. Définition	21
I.1.2. Epidémiologie.....	22
I.1.3. Etiologie	23
I.1.4. Physiopathologie	23
I.1.4.1. Cellule d'origine du clone de MW	23
I.1.4.1.1. Rappel sur le processus de la lymphopoïèse.....	23
I.1.4.1.2. Hypothèse sur l'origine du clone MW.....	25
I.1.4.2. Mutations de <i>MYD88</i>	25
I.1.4.3. Mutations de <i>CXCR4</i>	29
I.1.4.4. Autres altérations génétiques.....	33
I.1.5. Diagnostic clinique.....	35
I.1.5.1. Signes généraux	35
I.1.5.2. Signes liés à l'infiltration tumorale	35
I.1.5.3. Signes liés à l'IgM monoclonale sérique.....	36
I.1.5.3.1. Manifestations liées aux propriétés physicochimiques de l'IgM.....	36
I.1.5.3.2. Manifestations liées aux propriétés antigéniques de l'IgM	38
I.1.6. Diagnostic biologique	38
I.1.6.1. Immunochimie : électrophorèse des protéines sériques.....	38
I.1.6.2. Hémogramme	39
I.1.6.3. Myélogramme et biopsie ostéomédullaire	39
I.1.6.4. Immunophénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux.....	40
I.1.6.5. Biologie moléculaire	43
I.1.6.6. Cytogénétique.....	43
I.1.6.7. Biochimie	44
I.1.6.8. Auto-immunité.....	44
I.1.7. Diagnostics différentiels.....	44
I.1.7.1. MW et phases précoces de la maladie (M-MGUS et sMW).....	44
I.1.7.2. Lymphome de la zone marginale (LZM).....	45
I.1.7.3. Leucémie lymphoïde chronique.....	46
I.1.7.4. Myélome multiple à IgM	47
I.1.8. Evolution – Complications	47
I.1.9. Prise en charge symptomatique et/ou spécifique de la MW.....	47
I.1.9.1. Indications de traitement.....	47
I.1.9.2. Thérapeutique.....	48
I.1.9.2.1. Traitement symptomatique	48
I.1.9.2.2. Traitement de première ligne	48
I.1.9.2.3. Traitement des récurrences et des formes réfractaires.....	49
I.1.9.3. Critères de réponse thérapeutique	50
I.1.10. Facteurs pronostiques	51
II. Objectifs	53
III. Matériel et Méthode.....	54
III.1. Patients.....	54

III.2. Relecture cytologique médullaire	55
III.3. Immunophénotypage lymphocytaire et plasmocytaire	55
III.4. Revue diagnostique combinant cytologie et cytométrie	57
III.5. Biologie moléculaire : exploration des mutations de <i>MYD88</i> et <i>CXCR4</i>	58
III.5.1. Extraction d'ADN	58
III.5.2. Détermination du statut <i>MYD88</i>	59
III.5.2.1. PCR spécifique d'allèle <i>MYD88</i> L265P	59
III.5.2.2. Séquençage Sanger du gène <i>MYD88</i>	61
III.5.3. PCR spécifique d'allèle <i>CXCR4</i> S338X	63
III.5.4. Séquençage du gène <i>CXCR4</i>	64
III.5.4.1. Préparation des librairies.....	64
III.5.4.1.1. PCR d'amplification des cibles <i>CXCR4</i>	65
III.5.4.1.2. PCR de liaison des adaptateurs Illumina®.....	67
III.5.4.2. Validation des librairies	69
III.5.4.3. Préparation du pool de librairies.....	69
III.5.4.4. Séquençage haut débit	70
III.5.4.4.1. Préparation des réactifs Illumina®	70
III.5.4.4.2. Séquençage sur MiSeq Illumina®.....	70
III.5.4.4.3. Analyse bio-informatique des données de séquençage	71
IV. Résultats.....	73
IV.1. Caractéristiques patients	73
IV.2. Relecture cytologique	73
IV.3. Quantification du clone en cytométrie et reclassification diagnostique	75
IV.4. Analyse qualitative des immunophénotypes	76
IV.4.1. Caractérisation du phénotype lymphocytaire tumoral	76
IV.4.2. Caractérisation du phénotype plasmocytaire tumoral	78
IV.4.3. Analyse quantitative des populations tumorales.....	81
IV.5. Statut <i>MYD88</i> et classification diagnostique	83
IV.6. Exploration des mutations de <i>CXCR4</i>	85
IV.6.1. Evaluation de la PCR spécifique d'allèle pour dépister la mutation <i>CXCR4</i> S338X	85
IV.6.2. Mutations de <i>CXCR4</i> identifiées par séquençage haut débit.....	86
IV.7. Intégration de l'ensemble des résultats biologiques et interprétation	91
V. Discussion	94
V.1. Recrutement de la cohorte	94
V.2. Recueil des échantillons	95
V.3. Revue diagnostique	95
V.4. Analyse immunophénotypique du clone lymphoplasmocytaire	95
V.5. Analyse moléculaire : exploration des mutations de <i>MYD88</i> et <i>CXCR4</i>	97
VI. Conclusion et perspectives	100
Références bibliographiques	101
Annexes	111
Serment De Galien.....	124

Table des illustrations

Figure 1 : Immunoglobuline monoclonale μ ou macroglobuline d'après <i>Sapparapu et al.</i> (2)	21
Figure 2 : Différenciation des cellules B dans le centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires d'après <i>Küppers</i> (15)	24
Figure 3 : La maturation cellulaire normale B. La MW proviendrait de cellules ayant subi le processus d'hypermutation somatique au niveau des ganglions lymphatiques sans commutation de classe d'après <i>Ghobrial et al.</i> (21)	25
Figure 4 : Structure de MYD88. Le domaine TIR se compose d'hélices α représentées en rouge, de feuilletts β en jaune et de boucles BB ou « B-B loop ». Les mutations les plus courantes sont notées en noir. Adapté d'après <i>Gay et al.</i> (23) et <i>Ngo et al.</i> (24)	26
Figure 5 : Toll-like Receptors et sa protéine adaptatrice cytoplasmique MYD88, modifié d'après <i>Tassia et al.</i> (25)	26
Figure 6 : Voie de signalisation NF κ B MYD88-médiée, d'après <i>Treon et al.</i> (31) et adapté d'après <i>Lin et al.</i> (28)	27
Figure 7 : Signalisation de MYD88 et expression de NF κ B p65 dans le noyau de cellules Waldenström d'après <i>Treon et al.</i> (31)	28
Figure 8 : Voies de signalisation MYD88 médiée adapté d'après Sino Biological® (39)	29
Figure 9 : Structure tridimensionnelle de CXCR4 et principales mutations touchant sa partie C-terminale retrouvées dans la MW et le syndrome de WHIM. La mutation la plus fréquente dans la MW, S338X, est signalée par la flèche rouge (44)	30
Figure 10 : La voie de transduction CXCR4-CXCL12-CXCR7. Les voies activatrices sont représentées par des lignes droites, les voies inhibitrices par des lignes en pointillés. D'après <i>Scala</i> (45)	31
Figure 11 : Mécanisme de la neutropénie congénitale sévère dans le syndrome WHIM. D'après <i>McDermott et Murphy</i> (46)	32
Figure 12 : Les mutations somatiques de CXCR4 dans la MW sont similaires à celles retrouvées dans le syndrome de WHIM. D'après <i>Hunter et al.</i> (36)	33
Figure 13 : Fréquence des diverses anomalies génétiques retrouvées dans la MW (53–56)	34
Figure 14 : Examen du fond d'œil d'un patient atteint de MW montrant des signes d'hyperviscosité : des hémorragies périphériques (à gauche) et des vaisseaux rétinien dilatés (à droite) d'après <i>Treon et al.</i> (19)	36
Figure 15 : Cryoglobulinémie se manifestant par une acrocyanose sévère chez un patient atteint de MW avant (A) et après (B) réchauffement et plasmaphérèse, d'après <i>Treon et al.</i> (19)	37
Figure 16 : Lymphome lymphoplasmocytaire, d'après <i>Swerdlow et al.</i> (3)	40
Figure 17 : Biopsie ganglionnaire d'un patient atteint de MW, d'après <i>Swerdlow et al.</i> (3)	40
Figure 18 : Immunophénotype du clone MW : (A) Lymphocytes B tumoraux (B) Plasmocytes tumoraux, d'après <i>Gascue et al.</i> (73)	41
Figure 19 : Classification de la MW et des troubles liés à l'IgM (4)	45

Figure 20 : Sélection des patients de la série	54
Figure 21 : Calcul du pourcentage de lymphocytes tumoraux infiltrant la moelle osseuse	57
Figure 22 : Arbre décisionnel utilisé pour le reclassement diagnostique	58
Figure 23 : Amorces spécifiques d'allèles de la PCR-AS <i>MYD88</i> L265P, d'après <i>Varettoni et al.</i> (33).....	59
Figure 24 : Amorces spécifiques pour le séquençage Sanger du domaine TIR de <i>MYD88</i> ..	61
Figure 25 : Amorces spécifiques d'allèles de la PCR-AS <i>CXCR4</i> S338X, d'après <i>Xu et al.</i> (48).....	63
Figure 26 : Position des deux couples d'amorces dans la partie C-terminale de <i>CXCR4</i>	64
Figure 27 : Amorces de PCR des deux cibles de <i>CXCR4</i> avec la séquence de liaison à l'adaptateur	65
Figure 28 : PCR d'amplification des cibles <i>CXCR4</i>	66
Figure 29 : PCR de liaison des adaptateurs Illumina®.....	68
Figure 30 : Calcul de conversion des concentrations massiques en concentrations molaires	69
Figure 31 : Séquenceur MiSeq Illumina® (115).....	70
Figure 32 : <i>Pipeline</i> utilisé pour l'appel de variants	72
Figure 33 : Proportion de patients dans chaque groupe diagnostique présentant des lymphoplasmocytes ou des mastocytes dans la moelle au diagnostic.....	74
Figure 34 : Moelle osseuse d'un patient MW au x1000, on observe un plasmocyte (en haut à gauche), un <i>continuum</i> lymphoplasmocytaire et un mastocyte (en bas sur l'image).....	74
Figure 35 : Moelle osseuse d'un patient MW au x1000, on observe un <i>continuum</i> de différenciation lymphoplasmocytaire et un mastocyte.....	75
Figure 36 : Exemple de fenêtrage des lymphocytes totaux, des lymphocytes B et de leurs chaînes légères κ/λ	75
Figure 37 : Résultats de la revue diagnostique.....	76
Figure 38 : Immunophénotypage lymphocytaire dans le cas d'un M-MGUS	77
Figure 39 : Pourcentage de lymphocytes B totaux exprimant le CD38. Test statistique ANOVA (<i>analysis of variance</i>) au risque de 5%.....	77
Figure 40 : Immunophénotypage lymphocytaire dans le cas d'un LPL à IgG.....	78
Figure 41 : Immunophénotypage lymphocytaire dans le cas d'un G-MGUS	78
Figure 42 : Expression du CD19 et du CD56 sur les plasmocytes monotypiques de la série de patients (MW, M-MGUS et autres lymphomes).....	79
Figure 43 : Expression du CD20 sur les plasmocytes monotypiques de la série de patients (MW, M-MGUS et autres lymphomes).....	79
Figure 44 : Expression du CD19, du CD20 et du CD56 sur les plasmocytes (A) de MW, (B) de moelle réactionnelle, (C) de myélome, (D) de LPL et (E) de G-MGUS.....	80

Figure 45 : Fréquence de la monotypie plasmocytaire selon le taux d'IgM monoclonale	81
Figure 46 : Ratio entre les populations monotypiques plasmocytaires et lymphocytaires, exprimé en pourcentage. Test statistique ANOVA au risque de 5%.	82
Figure 47 : Ratio entre les populations lymphocytaires monotypiques et polytypiques exprimé en pourcentage. Test statistique ANOVA au risque de 5%.	82
Figure 48 : Ratio entre les populations plasmocytaires monotypiques et polytypiques exprimé en pourcentage. Test statistique ANOVA au risque de 5%.	83
Figure 49 : Résultats de PCR-AS <i>MYD88</i> L265P (migration électrophorétique au MultiNa™) pour 4 patients de la cohorte (T signifie témoin)	84
Figure 50 : Mutation c.794T>C, p.L265P de <i>MYD88</i> identifiée par séquençage Sanger et faiblement positive en PCR spécifique d'allèle	84
Figure 51 : Mutation c.649G>T, p.V217F de <i>MYD88</i> identifiée par séquençage Sanger	85
Figure 52 : Mutations c.656C>G, p.S219C et c.657T>C, p.S219C de <i>MYD88</i> identifiées par séquençage Sanger	85
Figure 53 : Résultats de PCR-AS <i>CXCR4</i> S338X (migration électrophorétique au MultiNa™) pour 10 patients de la cohorte	86
Figure 54 : Mutation c.C1013G, p.S338X de <i>CXCR4</i> retrouvée chez le patient 1 et vérifiée par séquençage Sanger	86
Figure 55 : Test de la température d'élongation du programme de la PCR d'amplification : Tm de 63°C, 64°C et 65°C sur 2 patients de la série (migration électrophorétique au MultiNa™).	87
Figure 56 : Validation des bibliothèques de séquençage pour 7 patients de la série (migration électrophorétique au MultiNa™)	88
Figure 57 : Représentation graphique du score qualité attribué à chaque cycle du séquençage (le séquençage en <i>paired-end</i> implique deux lectures de chaque séquence : R1 et R2)	89
Figure 58 : Représentation schématique des différentes mutations somatiques retrouvées par séquençage haut débit dans le domaine C-terminal de <i>CXCR4</i> parmi les échantillons de la cohorte	90
Figure 59 : Fréquence des mutations de <i>MYD88</i> et <i>CXCR4</i> , d'une population monotypique lymphocytaire ou plasmocytaire, de la présence de lymphoplasmocytes et de mastocytes en cytologie et d'un taux d'IgM monoclonale > 3 g/L selon le diagnostic.	91
Figure 60 : Fréquence des monotypies lymphocytaires et plasmocytaires selon le statut <i>MYD88</i> (VPP : Valeur Prédictive Positive, Sp : Spécificité)	92
Figure 61 : Principe d'un cytomètre en flux (126).....	113
Figure 62 : Présentation des résultats de cytométrie en flux.....	114
Figure 63 : Principe de la PCR (128).....	118
Figure 64 : Principe de la PCR spécifique d'allèle (129).....	118
Figure 65 : Principe de la méthode de séquençage Sanger (130)	119

Figure 66 : Séquençage Haut Débit, outil incontournable de biologie moléculaire (131).....	120
Figure 67 : Principe de la technologie Illumina® (132).....	121

Table des tableaux

Tableau 1 : Différences immunophénotypiques entre lymphocyte B normal et cellule monotypique de MW, d'après <i>Gascue et al.</i>	42
Tableau 2 : Score de Matutes.....	42
Tableau 3 : Table comparative des clés diagnostiques entre lymphome de la zone marginale et lymphome lymphoplasmocytaire/macroglobulinémie de Waldenström	46
Tableau 4 : Classification des réponses thérapeutiques dans la MW, d'après <i>Owen et al.</i> (107).....	51
Tableau 5 : Index pronostique international (ISSWM) d'après <i>Buske et Leblond</i> (101).....	52
Tableau 6: Composition des mélanges d'anticorps pour le panel lymphocytaire.....	55
Tableau 7 : Composition des mélanges d'anticorps pour le panel plasmocytaire.....	56
Tableau 8 : Composition du mix de la PCR-AS <i>MYD88</i> L265P	60
Tableau 9 : Programme d'amplification de la PCR-AS <i>MYD88</i> L265P.....	60
Tableau 10 : Composition du mix de la 1 ^{ère} PCR du séquençage Sanger.....	61
Tableau 11 : Programme d'amplification de la 1 ^{ère} PCR du séquençage Sanger	62
Tableau 12 : Composition du mix de la 2 ^{ème} PCR du séquençage Sanger	62
Tableau 13 : Programme d'amplification de la 2 ^{ème} PCR du séquençage Sanger.....	62
Tableau 14 : Composition du mix de la PCR-AS <i>CXCR4</i> S338X.....	64
Tableau 15 : Composition du mix de PCR d'amplification de <i>CXCR4</i>	66
Tableau 16 : Programme d'amplification de la 1 ^{ère} PCR de séquençage de <i>CXCR4</i>	67
Tableau 17 : PCR de liaison des adaptateurs Illumina®.....	68
Tableau 18 : Programme d'amplification de la 2 ^{ème} PCR de séquençage de <i>CXCR4</i>	69
Tableau 19 : Mutations somatiques retrouvées par séquençage haut débit dans le domaine C-terminal de <i>CXCR4</i> parmi les échantillons de la cohorte (le patient double muté <i>CXCR4</i> est signalé par un *)	90
Tableau 20 : Comparaison des taux d'IgM monoclonale, de l'infiltration médullaire tumorale, des manifestations cliniques et de la présence d'un syndrome d'hyperviscosité chez les sujets mutés et non mutés <i>CXCR4</i> de la série de patients	93

Liste des abréviations

AC : Adénylate Cyclase

AID : *Activation-Induced cytidine Deaminase*

AL : Amylose à chaîne Légère d'immunoglobuline

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

ANOVA : *Analysis of Variance*

ARID1A : *AT-rich Interactive Domain 1A*

BAM : *Binary Alignment Map*

BDR : Bortézomib Dexaméthasone Rituximab

BOM : Biopsie Ostéo-Médullaire

BTK : Bruton Tyrosine Kinase

bwa : *Burrows-Wheeler Alignment tool*

CBRS : Centre de Biologie et de Recherche en Santé

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMF : Cytométrie en Flux

CRP : Protéine C Activée

CSV : *Comma-Separated Values*

CXCR4 : *CXC-Chemokine Receptor-4*

DD : *Death Domain*

DLBCL : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules

DRC : Rituximab Cyclophosphamide Dexaméthasone

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPS : Electrophorèse des Protéines Sériques

FASTA : *Fast Alignment*

FASTQ : *Fast Alignment Quality*

FISH : *Fluorescence In Situ Hybridization*

FLC : *Free Light Chain*

FR : Facteur Rhumatoïde

FSC : *Forward Scatter*

G-MGUS : Gammopathie Monoclonale de Signification indéterminée à IgG

GRCh37 : *Genome Reference Consortium Human build 37*

GRK : *G protein-coupled Receptor Kinase*

HMS : Hypermutation Somatique
Ig : Immunoglobuline
IgM : Immunoglobuline Monoclonale μ
IgV : *Integrative Genomics Viewer*
IL : Interleukine
IL-1R : Récepteur à l'Interleukine 1
IP3 : Inositol-trisphosphate
IPSSWM : *International Prognostic Scoring System for Waldenström Macroglobulinemia*
IRD : *IgM-Related Disorders*
IV : Intra-Veineux
I κ B : *Inhibitor of Kappa-B*
I κ K : *Inhibitor of Kappa-B Kinase*
kDA : Kilo-Dalton
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LDH : Lactate Déshydrogénase
LFA-1 : *Lymphocyte Function-associated Antigen 1*
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
LLR : *Leucine-Rich Repeat*
LNH : Lymphome Non Hodgkinien
LPL : Lymphome Lymphoplasmocytaire
LZM : Lymphome de la Zone Marginale
MAG : *Myelin Associated Glycoprotein*
MBL : *Monoclonal B-cell Lymphocytosis*
MFI : *Mean Fluorescence Intensity*
MGUS : Gammopathie Monoclonale de Signification indéterminée
MM : Myélome Multiple
M-MGUS : Gammopathie Monoclonale de Signification indéterminée à IgM
MW : Macroglobulinémie de Waldenström
MYD88 : *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NFS : Numération et Formule Sanguine
NF κ B : *Nuclear Factor-Kappa B*
NGS : *Next Generation Sequencing*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORR : *Overall Response Rate*

PAS : *Periodic Acid-Schiff*
pb : Paires de Bases
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PFS : *Progression-Free Survival*
PIP2 : Phosphatidyl-Inositol-diphosphate
PLC : Phospholipase C
PRRs : *Pattern Recognition Receptors*
R : Rituximab
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
SC : Sous-Cutané
SDF-1 : *Stromal Derived Factor-1*
SLL : *Small Lymphocytic Lymphoma*
SLP : Syndrome Lymphoprolifératif
sMW : Macroglobulinémie de Waldenström *smoldering*
SNC : Système Nerveux Central
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*
Sp : Spécificité
SSC : *Side Scatter*
SWI/SNF : *Switch Mutants/Sucrose Non-Fermenting*
TAK1 : *TGF β Activated Kinase 1*
TLRs : *Toll-like Receptors*
Tm : *Temperature of melting*
TRAF6 : *Tumor necrosis factor Receptor–Associated Factor 6*
VAF : *Variant Allele Frequency*
VCF : *Variant Call Format*
VEP : *Variant Effect Predictor*
VHC : Virus de l'Hépatite C
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLA-4 : *Very Late Antigen-4*
VPP : Valeur Prédicative Positive
WGS : *Whole Genome Sequencing*
WT : *Wild type*

I. Introduction

I.1. La Macroglobulinémie de Waldenström

I.1.1. Définition

En 1944, le professeur Jan Gösta Waldenström décrit dans la revue *Acta Medica Scandinavica* (1), le cas de deux patients présentant épistaxis et adénopathies. Il observe également la présence d'une anémie normochrome associée à une thrombocytopénie, une hypofibrinogénémie, une vitesse de sédimentation augmentée, une hypoalbuminémie et une infiltration médullaire par des lymphocytes. A la différence des cas de myélome multiple (MM), caractérisés par une infiltration plasmocytaire médullaire, aucune douleur osseuse ni aucune anomalie radiographique ne sont relevées. Cependant, il met en évidence dans les deux cas, la présence en excès d'une globuline de haut poids moléculaire. Celle-ci migre dans la zone suivant les β -globulines à l'électrophorèse des protéines sériques (EPS). Il s'agit de l'immunoglobuline monoclonale μ (IgM) alors appelée macroglobuline. En effet, seules les immunoglobulines (Ig) de d'isotype IgM ont la capacité de s'assembler entre elles afin de former une structure pentamérique de haut poids moléculaire (900 KDa, Figure 1) alors que les autres types d'Ig (IgA, IgG, IgD et IgE) restent monomériques à l'exception des IgA sécrétoires libérées sous forme de dimères. Cette première description reste à ce jour caractéristique de la clinique et des anomalies biologiques de la Macroglobulinémie de Waldenström (MW).

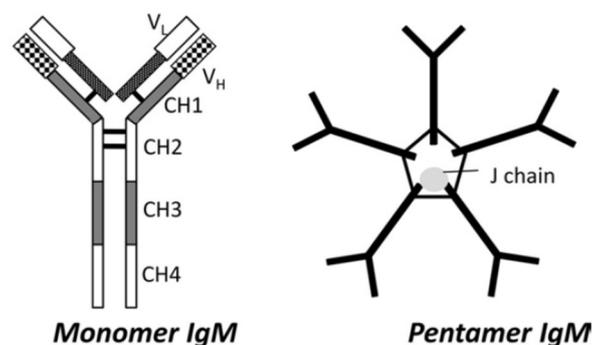


Figure 1 : Immunoglobuline monoclonale μ ou macroglobuline d'après *Sapparapu et al.* (2)

L'Organisation Mondiale de la santé (OMS) classe la MW parmi les lymphomes lymphoplasmocytaires associés à une IgM monoclonale (3). C'est un syndrome lymphoprolifératif B caractérisé par une infiltration médullaire de cellules lymphoplasmocytaires clonales se déclinant morphologiquement sous la forme d'un *continuum* de différenciation allant du lymphocyte mûr au plasmocyte mature. Cette population tumorale sécrète l'immunoglobuline qu'elle produit (IgM) et celle-ci s'accumule dans le sérum (pic monoclonal sérique de nature IgM à l'EPS).

Le diagnostic de cette hémopathie lymphoïde repose sur quatre critères définis lors du second *Workshop* International de la MW qui s'est tenu en 2003 (4) :

- Présence d'une IgM monoclonale sérique, quelle que soit sa concentration
- Infiltration médullaire par de petits lymphocytes présentant une différenciation plasmocytaire
- Infiltration de type paratrabéculaire, interstitielle ou diffuse de la moelle osseuse observée à la biopsie ostéomédullaire (BOM) selon le stade de la maladie
- Profil immunophénotypique : Ig de surface de type M, CD5±, CD10-, CD19+, CD20+, CD22+, CD23-, CD25+, CD27+, FMC7+, CD103-, CD138-

I.1.2. Épidémiologie

La Macroglobulinémie de Waldenström est une affection rare, représentant 1 à 2% des hémopathies malignes et dont l'incidence est de 3.8 par million d'habitants par an (5). L'âge médian au diagnostic est d'environ 70 ans, avec une prédominance masculine (ratio homme/femme : 2/1) et une incidence plus élevée chez les sujets Caucasiens que chez les sujets Afro-Américains (5,6).

La survie médiane est de plus de 10 ans pour les sujets de moins de 70 ans, 6 ans pour ceux âgés de 70 à 79 ans et de 4 ans pour ceux de plus de 80 ans. Chez les patients atteints de MW, la mortalité est imputable à la maladie dans seulement 28% des cas. Parmi les causes de décès les plus fréquentes on retrouve les tumeurs solides (20.1%), les incidents cardiaques (14.5%) et 28.6% d'entre elles ne sont pas connues (7).

Il existe des formes familiales de la MW, elles sont définies par la présence d'une atteinte lymphoproliférative B chez un parent du premier ou second degré par rapport au patient *princeps*. En effet, un sujet au premier degré d'un patient atteint de MW a 20 fois plus de risque de développer une MW et 3 à 5 fois plus de risque de développer un autre SLP B (LNH, LLC, MGUS) (8). De plus, ces MW familiales correspondraient à des formes plus graves avec des atteintes médullaires plus importantes, une apparition plus précoce, une réponse et une survie sans progression plus faible sous Rituximab que les formes sporadiques (9).

La gammopathie monoclonale de signification indéterminée à IgM (M-MGUS, pour *IgM Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*), constitue le principal facteur de risque de la MW avec une probabilité de progression estimée à 1.5% par an (10). En effet, il s'agit dans la plupart des cas de la même entité nosologique que la MW, mais à un stade très précoce (4).

I.1.3. Etiologie

La Macroglobulinémie de Waldenström ne présente pas de facteur causal clairement identifié. Cependant, certains désordres dysimmunitaires et divers facteurs génétiques semblent impliqués dans la lymphomagenèse de la MW.

L'éventuelle implication d'une stimulation antigénique de ces lymphocytes B dans la lymphomagenèse a donc été largement étudiée. De nombreux travaux rapportent un risque accru de développer un lymphome lymphoplasmocytaire (LPL)/MW chez les sujets présentant des pathologies auto-immunes (sclérose systémique, syndrome de Gougerot-Sjögren, anémie hémolytique auto-immune, polymyalgie rhumatismale et artérite à cellules géantes), infectieuses (hépatite C, VIH, rickettsioses, cytomégalovirus, ...), allergiques et inflammatoires (11).

Des facteurs génétiques ont également été documentés dans les formes familiales de la MW, notamment des remaniements impliquant les locus des régions chromosomiques 1q (D1S249) et 4q (D4S3030) (12). De plus, chez ces patients, il a été démontré que certains facteurs environnementaux, tels que l'exposition aux solvants organiques ou aux pesticides, augmentaient le risque de développer la maladie (13).

I.1.4. Physiopathologie

I.1.4.1. Cellule d'origine du clone de MW

I.1.4.1.1. Rappel sur le processus de la lymphopoïèse

La production des lymphocytes B a lieu en 2 étapes. La phase initiale se déroule dans la moelle osseuse et est indépendante de la stimulation antigénique. La seconde phase a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires et correspond à la réponse à un antigène.

Phase indépendante de l'antigène (moelle osseuse)

La cellule souche hématopoïétique totipotente donne naissance aux progéniteurs pluripotents qui eux-mêmes engendrent les progéniteurs communs myéloïdes et lymphoïdes. Le progéniteur lymphoïde a la capacité de se différencier en précurseurs B, T, NK et cellules dendritiques plasmacytoïdes. Le précurseur B prolifère et se différencie sous l'influence de l'IL-7 par des remaniements successifs des gènes d'Ig. Il passe par un premier stade pro-B, puis pré-B, un stade immature B avec expression de la chaîne lourde μ intracytoplasmique et enfin un stade B mature avec expression d'une IgM de surface.

Les B matures sont contre-sélectionnés lors de la rencontre avec les Ag du soi ; une réactivité excessive face au « soi » les entraînent alors vers l'apoptose (processus de mort cellulaire programmée). Cette sélection négative permet ainsi d'éliminer les lymphocytes B auto-réactifs. Les B matures qui passent cette première étape de sélection deviennent des lymphocytes B

matures naïfs avec coexpression d'une IgM et d'une IgD de surface. Ces cellules naïves ou transitionnelles quittent alors la moelle osseuse pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires.

Phase dépendante de l'antigène (organes lymphoïdes secondaires)

Cette phase survient lors de la réponse immunitaire à un antigène du non soi. Les lymphocytes B mobilisés dans cette réponse interagissent avec les lymphocytes T qui stimulent la prolifération des B par la sécrétion de diverses cytokines (en particulier l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-10) (14). Parmi ces lymphocytes B, certains sécréteront une IgM de faible affinité pour l'antigène, les autres migreront vers les follicules primaires où ils seront soumis à une intense prolifération. Les follicules primaires deviennent alors centres germinatifs (ou follicules secondaires).

C'est ici, dans le centre germinatif, que se poursuit la maturation du lymphocyte B. Elle consiste d'abord en un processus de maturation de l'Ig exprimée par la cellule reposant sur le phénomène d'hypermutation somatique (HMS) médiée par l'enzyme AID (*activation-induced cytidine deaminase*). L'HMS permet de générer des lymphocytes B avec une Ig de haute affinité pour l'Ag. Elle consiste en l'introduction de mutations dans la séquence d'ADN codant pour l'immunoglobuline. Les lymphocytes B sont alors soumis à une sélection positive face à l'Ag du non soi. Seules les cellules avec une Ig fonctionnelle et de haute affinité survivent, les autres sont éliminées par induction d'apoptose. Secondairement aux hypermutations somatiques, le processus de commutation isotypique ou switch, permettra la production des autres isotypes d'Ig (IgA, IgG, IgE). Ces lymphocytes B ayant subi des hypermutations somatiques du gène des Ig et changé d'isotype (IgA, IgG, IgE) deviendront alors soit des plasmocytes producteurs d'anticorps, soit des lymphocytes B mémoires puis migreront vers la pulpe rouge de la rate, la médullaire ganglionnaire ou la moelle osseuse (Figure 2) (15).

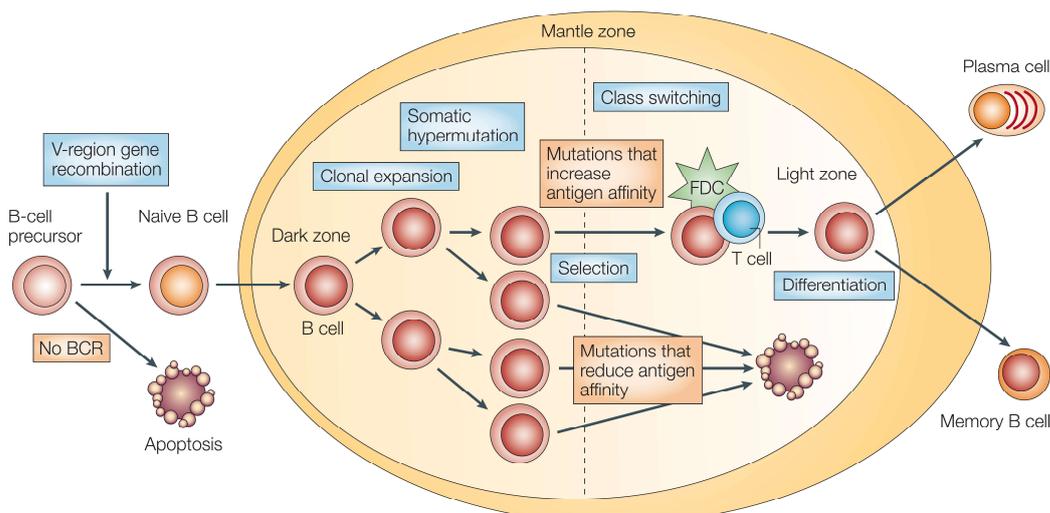


Figure 2 : Différenciation des cellules B dans le centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires d'après Küppers (15)

I.1.4.1.2. Hypothèse sur l'origine du clone MW

Le statut mutationnel des gènes de la région variable (V) des sujets MW a été étudié par *Sahota et al.* (16)(17). Cette analyse a mis en évidence deux éléments fondamentaux : la présence d'une mutation somatique des gènes VH et l'absence totale de commutation isotypique des cellules lymphomateuses de MW. Ces résultats suggèrent que la cellule tumorale est un lymphocyte B bloqué dans son processus de développement, après son passage dans le centre germinatif, mais avant le stade de plasmocyte (Figure 3). Il pourrait s'agir d'une cellule mémoire IgM+ et/ou IgM+, IgD+ présentant un défaut de *switch* isotypique. Ce profil est également retrouvé dans les cas de M-MGUS (18). Il est à noter que les taux d'IgA et d'IgG sont le plus souvent diminués chez les patients atteints de MW et qu'ils ne sont pas corrigés par le traitement ce qui suggère également un défaut plus général de réarrangement des chaînes lourdes, au-delà du clone B tumoral (19,20).

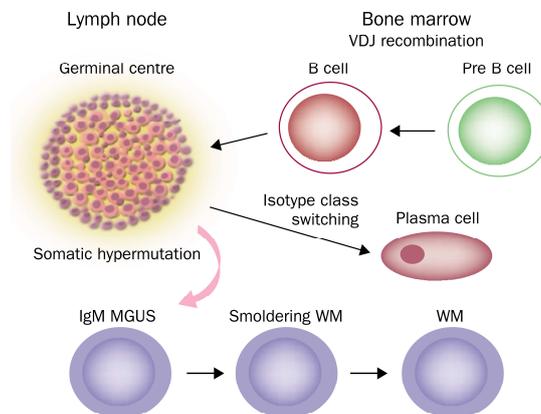


Figure 3 : La maturation cellulaire normale B. La MW proviendrait de cellules ayant subi le processus d'hypermutation somatique au niveau des ganglions lymphatiques sans commutation de classe d'après *Ghobrial et al.* (21).

I.1.4.2. Mutations de *MYD88*

Le gène *MYD88*, positionné en 3p22.2 (bras court du chromosome 3), code pour une protéine adaptatrice cytoplasmique de 296 acides aminés qui contient deux domaines conservés : une partie C-terminale ou domaine TIR (Toll/IL-1R/R) qui interagit avec les *Toll-like Receptors* (TLRs) ou le récepteur à l'interleukine 1 (IL-1) et un domaine de mort (DD pour *death domain*) dans sa partie N-terminale, impliqué dans la signalisation en aval. Ces domaines sont séparés par un domaine intermédiaire impliqué dans la signalisation intracellulaire avec le DD (22) (Figure 4).

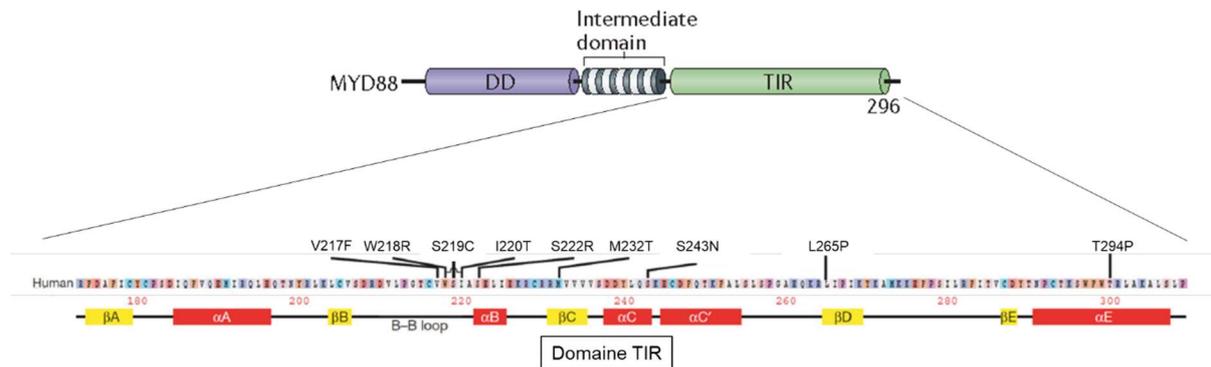


Figure 4 : Structure de MYD88. Le domaine TIR se compose d'hélices α représentées en rouge, de feuillets β en jaune et de boucles BB ou « B-B loop ». Les mutations les plus courantes sont notées en noir. Adapté d'après Gay *et al.* (23) et Ngo *et al.* (24)

Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I composés (Figure 5) :

- d'un domaine extracellulaire constitué de motifs répétés riches en leucine (LRR pour *Leucine-Rich Repeat*)
- d'un domaine transmembranaire riche en cystéine
- et d'un domaine cytoplasmique de 150-200 acides aminés commun avec celui des récepteurs de l'IL-1 (IL-1R de type 1 et 2), il s'agit du domaine TIR intracellulaire qui induit l'activation de différentes voies de signalisation via des protéines adaptatrices telles que MYD88

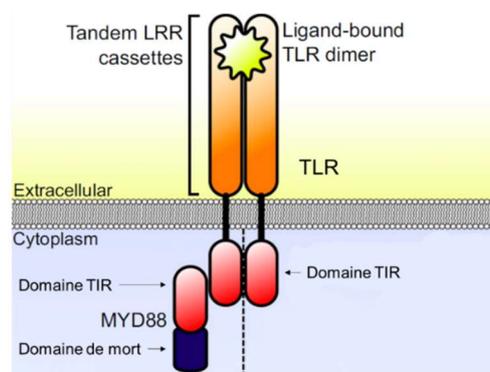


Figure 5 : Toll-like Receptors et sa protéine adaptatrice cytoplasmique MYD88, modifié d'après Tassia *et al.* (25)

Ces récepteurs appartiennent à la famille des *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) et jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire innée (26). Dix TLRs ont été identifiés chez l'homme, chacun d'entre eux étant spécifique d'un ligand. Ils sont majoritairement situés sur les cellules folliculaires dendritiques et les macrophages. Leur voie de signalisation dépend de MYD88, à l'exception du TLR3 (27).

Lors de l'activation d'un TLR ou du récepteur de l'IL-1 (IL-1R) par son ligand, Le récepteur recrute MYD88 qui se dimérise et recrute à son tour puis active par phosphorylation les protéines IRAK-4 et IRAK-1/2, pour former une structure appelée « Myddosome » (28).

L'effecteur final du myddosome est l'activation du facteur de transcription NFκB (*Nuclear Factor-Kappa B*) via l'implication des protéines TRAF6 (*Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated factor 6*), TAK1 (*TGFβ Activated Kinase 1*) et le complexe hétérotrimérique IκK (*Inhibitor of Kappa-B Kinase*, composé des sous-unités IκKα, IκKβ et IκKγ alias NEMO). NFκB régule entre autres le développement, la maturation et la survie des lymphocytes B (29). Dans la cellule au repos, les sous-unités p50 et p65 de NFκB sont séquestrées dans le cytoplasme par la protéine IκB (*Inhibitor of kappa B*). Lorsque le myddosome est activé, IκB est phosphorylé puis dégradé par le protéasome (30) libérant les sous-unités p50 et p65 du complexe NFκB. Celles-ci vont pénétrer le noyau, activant ainsi la transcription de gènes cibles (Figure 6) (31).

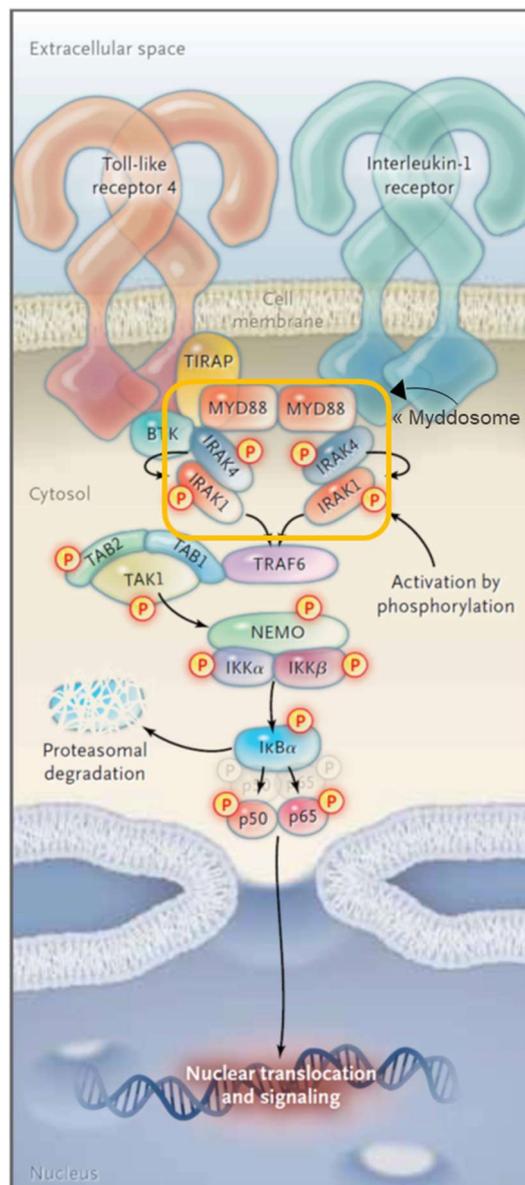


Figure 6 : Voie de signalisation NFκB MYD88-médiée, d'après *Treon et al.* (31) et adapté d'après *Lin et al.* (28)

En 2012, les travaux de *Treon et al.* (31) appliquant le séquençage du génome entier de cellules de MW ont permis d'identifier une mutation somatique récurrente L265P du gène *MYD88*. Sur le transcrit NM_002468.4, il s'agit de la substitution d'une thymine par une cytosine c.794T>C, aboutissant au remplacement d'une leucine par une proline p.L265P et a été retrouvée chez 91% des sujets atteints de LPL (MW et LPL non IgM) et dans 50 à 80% des cas de M-MGUS (32,33). C'est une mutation somatique hétérozygote, rarement homozygote (<10% des cas), auquel cas elle résulte le plus souvent d'une disomie uniparentale acquise transformant le génotype de la tumeur (34–36). Si elle n'est pas spécifique à 100% de l'entité MW (mutation présente chez 4% des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC) (37), 7% des lymphomes de la zone marginale (LZM) (31) et 29% des lymphomes B à grandes cellules (24)), elle n'est pas retrouvée dans le myélome multiple et apporte une aide considérable dans le diagnostic différentiel de lymphome non Hodgkinien de type B (LNH-B) de bas grade avec pic IgM (38).

Ngo et al. (24) avaient constaté qu'en réprimant la signalisation de *MYD88*, la voie NFκB était inhibée et la survie cellulaire diminuée. *Treon et al.* (31) obtenaient des résultats similaires sur des cellules médullaires lymphomateuses type MW mutées *MYD88* L265P et cultivées en présence d'un inhibiteur d'homodimérisation ou d'un inhibiteur IRAK 1/4 kinase (Figure 7).

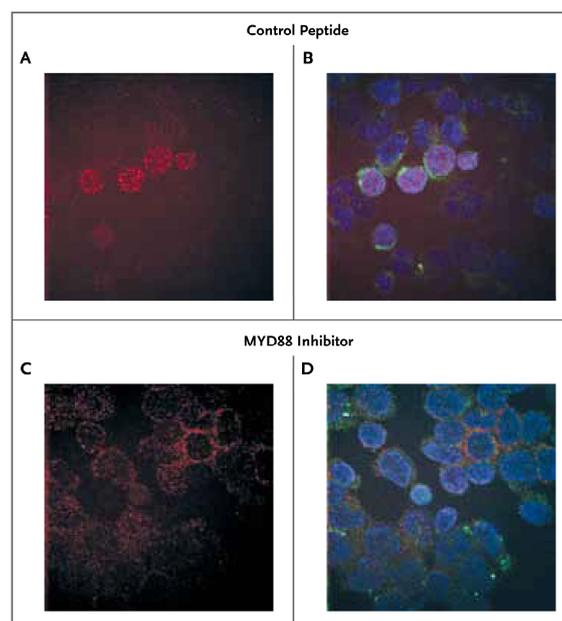


Figure 7 : Signalisation de *MYD88* et expression de NFκB p65 dans le noyau de cellules Waldenström d'après *Treon et al.* (31)

Observation de la fluorescence de la molécule NFκB p65 dans le noyau et le cytoplasme de cellules médullaires exprimant la mutation *MYD88* L265P d'un patient atteint de MW après traitement *in vitro* avec un peptide témoin (Panels A et B) ou un peptide inhibant l'homodimérisation de *MYD88* (Panels C et D). La coloration rouge signe la présence de NFκB p65 dans les cellules.

NFκB p65 est retrouvé dans le noyau lorsque les cellules sont traitées avec un peptide témoin (Panel A) et dans le cytoplasme lorsqu'elles sont traitées avec l'inhibiteur du *MYD88* (Panel C).

Le marquage par le 4',6-diamidine-2-phénylindole dihydrochloride (DAPI) (B et D) fait fluorescer le noyau en bleu. Dans les cellules du groupe B, le noyau est rouge et bleu, NFκB p65 est donc présent. Dans le groupe D, le traitement par inhibiteur de *MYD88* entraîne une fluorescence rouge donc l'expression de NFκB p65 dans le cytoplasme et non plus dans le noyau des cellules.

De plus, dans l'étude de *Ngo et al.* (24), l'inhibition du signal de MYD88 par l'inhibiteur de kinase IRAK1/4 entraînait une diminution de sécrétion des IL-6 et IL-10 ainsi que de la phosphorylation de STAT3. Par conséquent, MYD88 est également impliqué dans l'activation de la voie de signalisation pro-prolifératrice JAK/STAT (Figure 8).

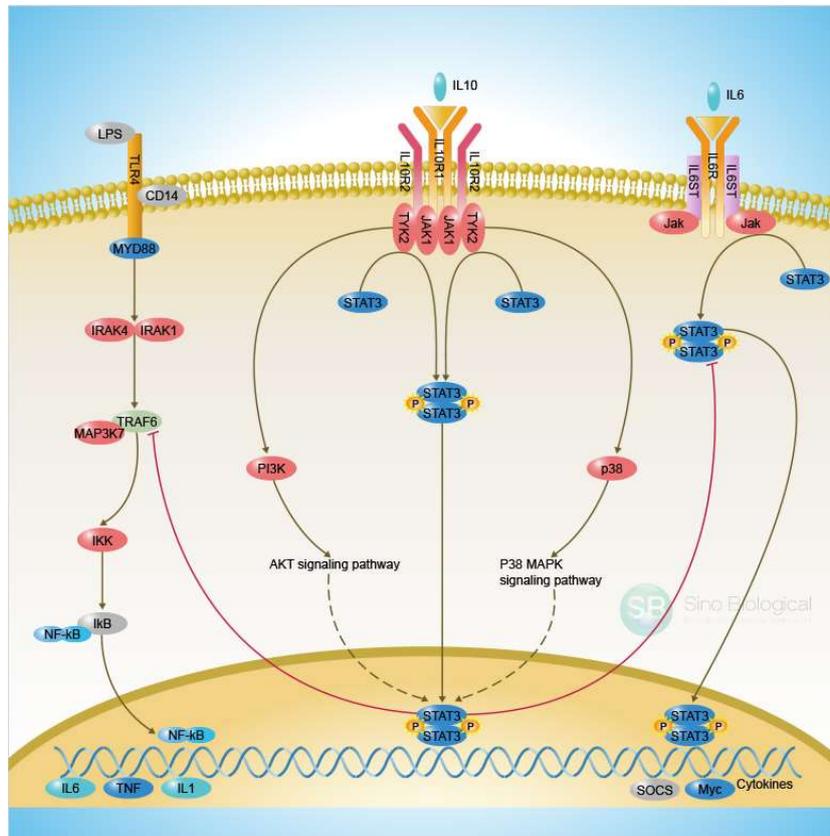


Figure 8 : Voies de signalisation MYD88 médiée adaptée d'après Sino Biological® (39)

La molécule adaptatrice MYD88 joue un rôle essentiel dans les voies de signalisation intracellulaires anti-apoptotiques et prolifératives. La mutation activatrice L265P de *MYD88* n'est cependant pas la seule retrouvée, d'autres mutations somatiques de ce gène ont été décrites dans la MW par *Treon et al.* (40) (mutations M232T, S243N) et dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) par *Ngo et al.* (24) (mutations V217F, S219C, M232T, S243N et T294P). Elles sont représentées sur la Figure 4.

I.1.4.3. Mutations de *CXCR4*

Le récepteur aux chimiokines *CXC-Chemokine Receptor-4* (*CXCR4*) ou CD184, a initialement été décrit comme étant le corécepteur du CD4, indispensable au passage du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 dans les lymphocytes T CD4 (41). Il appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). *CXCR4* est présent de façon ubiquitaire sur les cellules hématopoïétiques, il est également retrouvé sur les cellules ganglionnaires, hépatiques, pulmonaires, cérébrales, cardiaques,

rénales, thymiques, gastriques, pancréatiques, spléniques, ovariennes et intestinales (42). Les récepteurs de cette famille ont la capacité de reconnaître plusieurs chimiokines et, inversement, la plupart des chimiokines peuvent fixer plus d'un récepteur. CXCR4 en revanche, possède un ligand unique : CXCL12 ou SDF-1 (*Stromal Derived Factor-1*). CXCL12 est une chimiokine (ou cytokine chimiotactique) qui participe au recrutement des cellules CXCR4⁺ ou CXCR7⁺ dans les tissus cibles comme la moelle osseuse par exemple (43).

La protéine CXCR4 est codée par un gène présent sur le chromosome 2 (locus 2q21), elle est composée de 352 acides aminés et contient un domaine extracellulaire comprenant un domaine N-terminal et 3 boucles extracellulaires (ECL1, 2 et 3), une partie transmembranaire et un domaine intracytoplasmique constitué de 3 boucles intracellulaires et d'un domaine C-terminal (41). Ce domaine C-terminal contient des sites de phosphorylation de sérine qui régulent la signalisation intracellulaire, il est le site des mutations récurrentes somatiques ou constitutionnelles retrouvées dans ce gène (Figure 9).

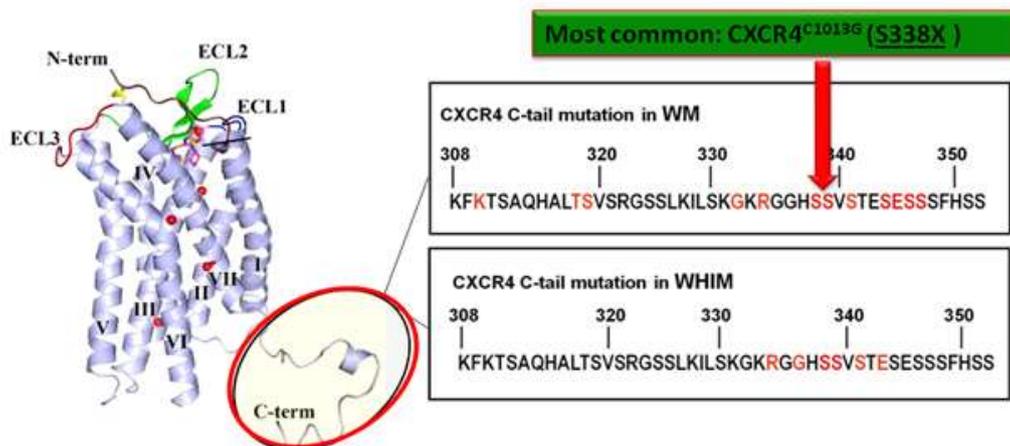


Figure 9 : Structure tridimensionnelle de CXCR4 et principales mutations touchant sa partie C-terminale retrouvées dans la MW et le syndrome de WHIM. La mutation la plus fréquente dans la MW, S338X, est signalée par la flèche rouge (44)

La liaison du ligand CXCL12 à son récepteur CXCR4 entraîne une modification de la conformation de ce dernier et l'activation de sa protéine G. Une fois activée, celle-ci se dissocie en deux sous-unités : α monomérique et $\beta\gamma$ dimérique.

- La sous-unité α inhibe la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) par inhibition de l'adénylate cyclase (AC). Ceci entraîne l'activation des voies NF κ B, JAK/STAT, PI3K/AKT, mTOR et MAPK qui régulent la survie, la prolifération et la chimiotaxie cellulaire. De plus, la sous-unité α active la phospholipase C (PLC) ce qui entraîne la production de phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP2) et inositol trisphosphate (IP3), médiateurs contrôlant la libération calcique intracellulaire.
- La sous-unité $\beta\gamma$ active la voie de signalisation MAPK à médiation Ras, régulant la prolifération et la chimiotaxie cellulaire.

Le chimiotactisme cellulaire est un mécanisme complexe impliquant la polymérisation d'actine, la formation d'uropodes, l'activation d'intégrines et le réarrangement du cytosquelette.

Une fois l'interaction ligand-récepteur terminée, un phénomène de « désensibilisation » se produit, cela correspond à un rétrocontrôle négatif du signal. CXCR4 est tout d'abord découplé de sa protéine G par phosphorylation dépendante de la kinase GRK (*G protein-coupled Receptor Kinase*) sur son domaine C-terminal. Puis les β -arrestines alors recrutées empêchent une nouvelle liaison de CXCR4 à une protéine G et favorisent son internalisation. CXCR4 s'engage ensuite vers une dégradation lysosomale post-ubiquitination (Figure 10) (45).

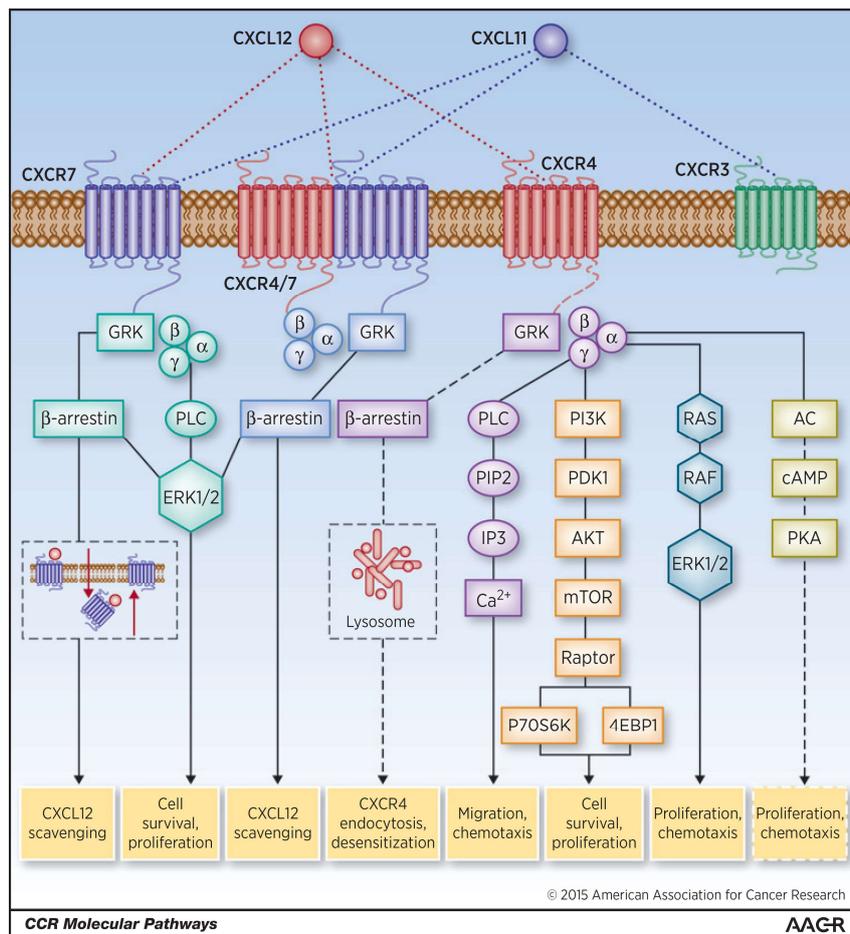


Figure 10 : La voie de transduction CXCR4-CXCL12-CXCR7. Les voies activatrices sont représentées par des lignes droites, les voies inhibitrices par des lignes en pointillés. D'après *Scala* (45).

Des mutations constitutionnelles de ce gène avaient été précédemment découvertes dans la maladie de WHIM (*Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis*). Ce déficit immunitaire rare et complexe est responsable d'épisodes infectieux et du développement de verrues diffuses HPV-induites. Les mutations de CXCR4 à l'origine de la pathogénèse de ce syndrome entraînent un blocage de l'internalisation des récepteurs après stimulation par le ligand (CXCL12) dans les cellules myéloïdes. Le récepteur CXCR4 est alors constamment activé retardant ainsi la libération des polynucléaires neutrophiles de la moelle osseuse au sang et favorisant le « *homing* » (domiciliation) de ces derniers (du sang vers la moelle osseuse) responsable de la neutropénie par « *myelokathexis* » (Figure 11) (46).

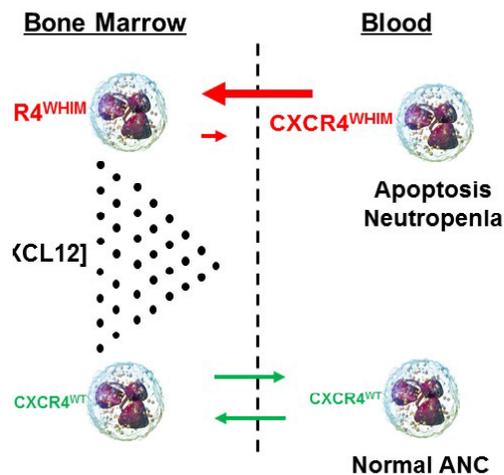


Figure 11 : Mécanisme de la neutropénie congénitale sévère dans le syndrome WHIM. D'après McDermott et Murphy (46)

Les mutations somatiques concernant la partie C-terminale de *CXCR4* ont été mises en évidence par *whole genome sequencing* (WGS, ou séquençage du génome entier) par Hunter *et al.* en 2014 (36) (Figure 12). Parmi les 30 sujets de l'étude, tous atteints de MW, 27% présentaient des mutations de *CXCR4*. Ces mutations apparaissent donc comme la deuxième mutation la plus fréquemment retrouvée chez les sujets MW après les mutations de *MYD88* auxquelles elles sont souvent associées.

En 2008, les travaux de Ngo *et al.* (43) ont mis en évidence le rôle de l'axe *CXCR4/CXCL12* dans la migration et l'adhésion des cellules lymphomateuses au niveau de la moelle osseuse de sujets atteints de MW. Dans cette étude, ils ont révélé différentes anomalies d'expression de molécules d'adhésion telles que *VLA-4* (*Very Late Antigen-4* ou intégrin $\alpha4\beta1$) ou *LFA-1* (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*) et de certains récepteurs de chimiokines dont *CXCR4*. Ce dernier était surexprimé dans des cellules isolées de moelle osseuse impliquant l'activation des voies de signalisation comme *MAKP/ERK* et *AKT*. De plus, l'inhibition spécifique de *CXCR4* par son inhibiteur *AMD3100* ou *plerixafor* était associée à une diminution des capacités de migration et d'adhésion des lignées cellulaires de MW. Cette inhibition entraînait d'ailleurs une sensibilité cellulaire accrue au *bortézomib*, suggérant une possible introduction de cette molécule dans de futurs essais cliniques. L'activation de *CXCR4* joue donc un rôle important dans le processus de *homing* ou domiciliation médullaire mais également dans la prolifération et la survie des cellules tumorales de MW.

Deux types de mutations somatiques sont retrouvées sur les cellules lymphomateuses de la MW. Elles concernent toutes les deux la région C-terminale de *CXCR4* : les mutations *stop gained* (ou non-sens), qui tronquent la partie distale de 15 à 20 acides aminés et les mutations *frameshift* (ou décalage du cadre de lecture), retrouvées dans les 40 derniers acides aminés de cette région (36). Bien qu'à ce jour, une trentaine de mutations aient été décrites dans la MW (36,47–49), une mutation est plus fréquemment retrouvée. Celle-ci génère un codon stop à la place d'une sérine en position 338 : c.1013C>G (ou C>A) : p.S338X (Figure 12).

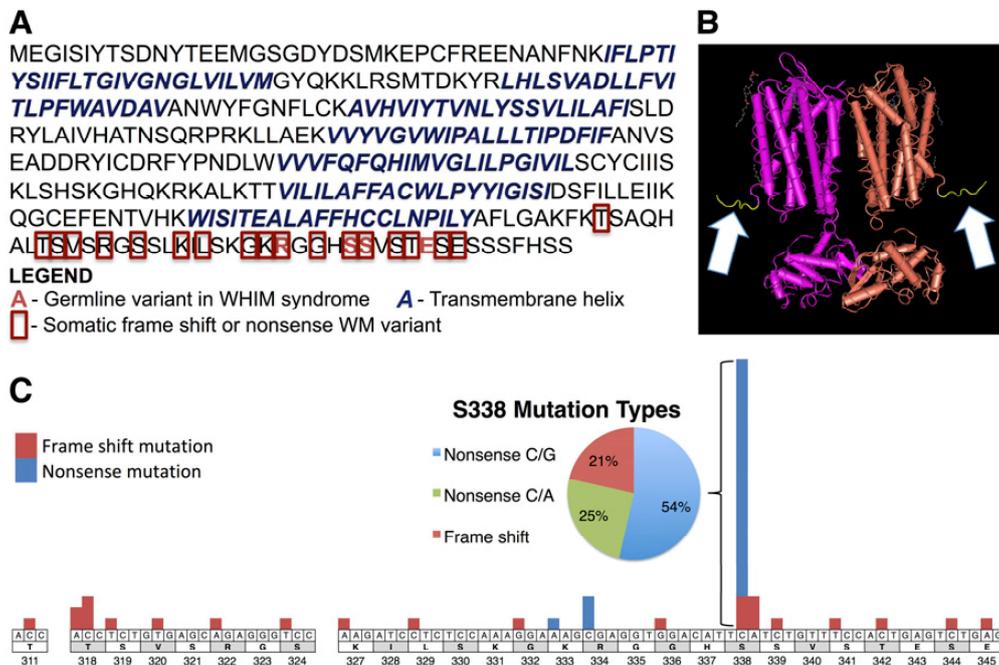


Figure 12 : Les mutations somatiques de CXCR4 dans la MW sont similaires à celles retrouvées dans le syndrome de WHIM. D'après *Hunter et al.* (36)

(A) L'étude de la séquence protéique (NP_003458.1) démontre que, comme dans le cas du syndrome WHIM, ces mutations entraînent une troncation de la queue cytosolique qui contient les phosphosérines régulatrices, laissant intacte la région à sept hélices transmembranaires qui intervient dans la signalisation et la liaison du ligand. (B) Structure homodimérique de CXCR4 avec sa queue C-terminale en jaune et indiquée par les flèches blanches. (C) Localisation précise et nombre de mutations somatiques de type WHIM dans la MW au niveau du transcrite et résumé détaillé du type de mutation touchant S338.

Une étude portant sur 429 patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs a recherché la présence de la mutation *CXCR4* S338X dans divers échantillons tels que des prélèvements médullaires, pulmonaires, rénaux, ... (50). Elle était présente dans 37/131 (28,2%) des cas de MW et 8/40 (20%) des M-MGUS mais également 1/14 (7%) des LZM spléniques et 1/75 (1,3%) des DLBCL. Cependant, elle n'était pas retrouvée chez les sujets atteints de LLC, de leucémie à tricholeucocytes, de myélome à IgM ou de MGUS à IgG et IgA. Ceci corrobore l'implication de la mutation de *CXCR4* dans la lymphomagénèse de la MW et des M-MGUS.

I.1.4.4. Autres altérations génétiques

Les cellules tumorales de la MW sont difficiles d'accès à l'analyse cytogénétique du fait de leur faible index mitotique, expliquant le peu de documentation disponible à ce sujet. Cependant, une étude menée en 2013 par *Nguyen-Khac et al.* (51) a permis de décrire un certain nombre d'anomalies. Cette étude, menée sur 174 patients non traités atteints de MW, a rapporté la présence d'anomalies chromosomiques clonales dans 50% des cas et des caryotypes complexes (plus de 3 anomalies) dans 1/3 des cas. Parmi les anomalies cytogénétiques retrouvées, on note la del(6q) (50% des cas), la t(9;14)(p13;q32) (50%), la trisomie 4 totale ou

partielle (8%), le gain 6p (17%), la trisomie 3 (10%) et les délétions 13q et 17p (10%) (51,52). Les anomalies chromosomiques sont représentées par ordre de fréquence sur la Figure 13.

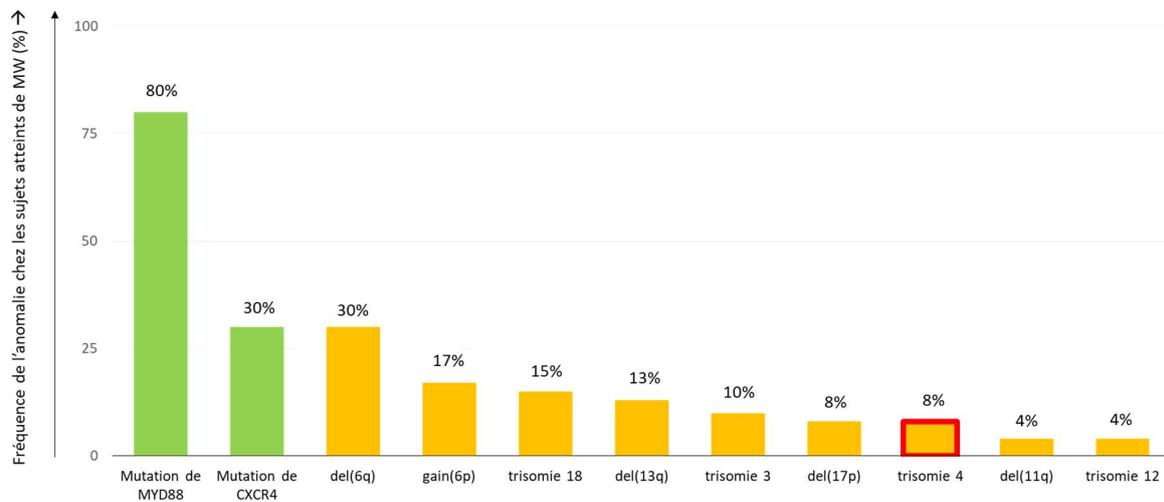


Figure 13 : Fréquence des diverses anomalies génétiques retrouvées dans la MW (53–56)

Si de nombreuses anomalies sont retrouvées, aucune n'est vraiment spécifique de la MW. Toutefois, la trisomie 4 (signalée en rouge sur la Figure 13) est plus fréquemment observée dans la MW que dans les autres syndromes lymphoprolifératifs et permet de définir un profil cytogénétique assez spécifique (56). De plus, la valeur pronostique de ces anomalies n'est pas très bien définie mais les trisomies 12, les délétions 13q et 17p sont associées à une valeur pronostique péjorative (56,57).

Au niveau moléculaire, d'autres mutations sont retrouvées dans la MW, mais leur implication dans la lymphomagenèse n'est pas clairement démontrée. Les mutations du gène *ARID1A* apparaissent comme les troisièmes plus fréquemment identifiées après celles de *MYD88* et *CXCR4*. On les retrouve dans 17% des cas de MW (36). *ARID1A* (*AT-rich Interactive Domain 1A*), fait partie de la famille des SWI (*switch mutants*) / SNF (*sucrose non-fermenting*). Ces protéines sont essentielles au remodelage de la chromatine et ont un rôle primordial dans la régulation épigénétique de l'expression génique. En effet, le complexe SWI/SNF, constitué de 9 à 12 partenaires protéiques, possède une activité ATPase qui permet le remodelage du nucléosome (58). Il a été démontré que les sujets atteints de MW et mutés *MYD88* et *ARID1A* présentaient des formes plus agressives que les sujets ne possédant pas de mutation *ARID1A* (31). On peut alors supposer que cette mutation surajoutée est susceptible de favoriser la progression de la maladie et donc avoir un impact pronostique.

Des mutations impliquant d'autres gènes que ceux précédemment cités ont également été mises en évidence, notamment : *TP53*, *HIST1H1E*, *TNFAIP3*, *TRAF3* ou *MYBBP1A* (31,36). Cependant, des études ciblées et sur de plus grandes cohortes sont nécessaires afin de prouver leur rôle dans la maladie.

I.1.5. Diagnostic clinique

L'expression clinique de la MW comprend d'une part, les signes systémiques communs aux lymphomes de type non-Hodgkiniens, mais aussi des manifestations résultant directement de la présence de la tumeur : infiltration tumorale et sécrétion d'IgM. Néanmoins, il existe des formes asymptomatiques de la maladie appelées « *smoldering* » (sMW) parfois associées à un taux élevé d'IgM et une infiltration médullaire importante. De plus, les M-MGUS, correspondant au stade pré-MW, n'ont par définition pas d'expression clinique. Toutefois des troubles liés à l'IgM ou *IgM-related disorder* (IRD) sont parfois relevés. La distinction entre MW et M-MGUS est basée sur le degré d'infiltration de la moelle par le clone avec un seuil à 10% (voir *infra*).

I.1.5.1. Signes généraux

Les patients atteints de MW peuvent présenter des symptômes aspécifiques tels que : fièvre, asthénie, perte de poids et sueurs nocturnes orientant le diagnostic vers un processus tumoral.

I.1.5.2. Signes liés à l'infiltration tumorale

La MW touche principalement la moelle osseuse et provoque une anémie (pâleur, asthénie, dyspnée, tachycardie) et plus rarement d'autres cytopénies : leuco-neutropénie (risque infectieux), thrombopénie (risque hémorragique) ou pancytopenie. L'anémie, critère majeur de mise en place d'un traitement de la maladie s'explique logiquement par l'insuffisance médullaire, mais aussi par l'hémodilution induite par la présence de l'IgM sérique, l'hyperviscosité sanguine qui entraîne une diminution de la sécrétion d'EPO (59) et la présence d'une carence martiale due à la sécrétion d'hepcidine par les cellules tumorales. De plus, elle peut être majorée par l'hypersplénisme et l'hémolyse (agglutinines froides) (19). Un syndrome tumoral est observé dans un tiers des cas avec des adénopathies et/ou une hépatosplénomégalie. Les autres organes sont plus rarement atteints (5% des cas) parmi lesquels : le poumon, la peau et le rein (60). L'atteinte du système nerveux central (SNC) est une complication rare de la MW appelée syndrome de Bing-Neel. Les cellules tumorales envahissent habituellement la substance blanche ; les leptoméninges et la moelle épinière peuvent être touchées dans les formes diffuses (61). La présentation clinique de ce syndrome est hétérogène avec des manifestations neurologiques diverses comme des troubles de l'équilibre avec ataxie, des maux de tête, des troubles cognitifs, la perte de mémoire ou la démence, mais aussi des signes moteurs et sensoriels. La présence d'une neuropathie périphérique (pouvant également être reliée à la présence de l'IgM) peut générer un retard au diagnostic. Ces symptômes évoluent lentement sur plusieurs semaines ou mois (62). Le syndrome de Schnitzler, exceptionnel, fait partie des manifestations systémiques associées aux gammopathies monoclonales. Mal connu, il correspondrait à un syndrome auto-inflammatoire lié à un profil cytokinique particulier. Ce dernier se manifeste par un urticaire associé à de la fièvre ou des douleurs ostéoarticulaires (60,63).

I.1.5.3. Signes liés à l'IgM monoclonale sérique

Du fait de ses propriétés physico-chimiques et antigéniques, l'IgM monoclonale sérique sécrétée par la population monotypique lymphoplasmocytaire tumorale est susceptible d'engendrer des symptomatologies diverses, associées ou non.

I.1.5.3.1. Manifestations liées aux propriétés physicochimiques de l'IgM

Syndrome d'hyperviscosité

Le syndrome d'hyperviscosité, se manifestant par des saignements muqueux, des troubles visuels et neurologiques ont été mis en évidence lors de la première description de la MW par J. Waldenström en 1944 (1). Des manifestations cardiaques sont possibles, allant jusqu'à la défaillance cardiaque, très rare, due à l'expansion du volume plasmatique suite à l'augmentation de la pression oncotique induite par la présence de la macroglobuline. L'IgM monoclonale possède une structure pentamérique, un poids moléculaire de 900 kDa et par conséquent une viscosité intrinsèque élevée. A des titres subnormaux ou élevés dans le sérum, l'IgM augmente la pression osmotique et la résistance au flux sanguin en fixant des molécules d'eau sur ses résidus carbohydrates (19). Elle peut également interagir avec les érythrocytes et diminuer leur déformabilité (64). L'examen du fond de l'œil permet le diagnostic de l'hyperviscosité qui provoque une dilatation des veines rétiniennes, des hémorragies et des papilloédèmes (Figure 14) (19). Hormis le traitement étiologique de ce syndrome qui permet de diminuer la production de l'IgM, le traitement d'urgence reste à ce jour la plasmaphérèse. L'intérêt de ces échanges plasmatiques a initialement été démontré sur deux sujets atteints de MW par Schwab et Fahey (65) en 1950.

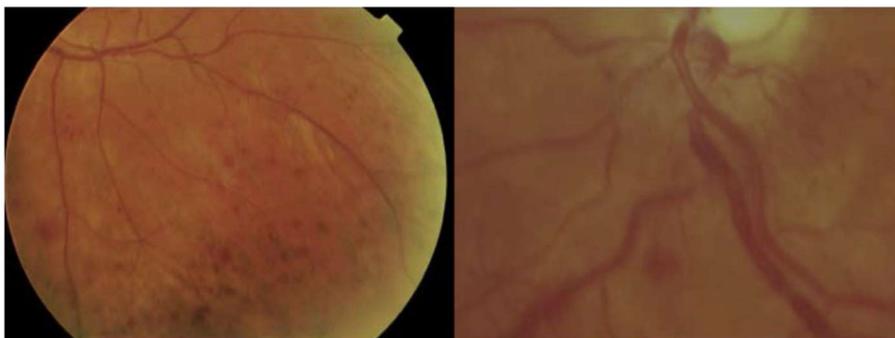


Figure 14 : Examen du fond d'œil d'un patient atteint de MW montrant des signes d'hyperviscosité : des hémorragies périphériques (à gauche) et des vaisseaux rétiniens dilatés (à droite) d'après Treon et al. (19).

Syndrome hémorragique

La MW est souvent associée à des troubles de l'hémostase. L'interaction de l'IgM avec les protéines de la coagulation tels que le facteur II, le VIII ou le facteur Willebrand peut entraîner des syndromes hémorragiques (66). Par exemple, une étude en 2012 a démontré l'intérêt de l'exploration systématique du facteur von Willebrand chez les sujets MW car 13% d'entre eux

présentent un déficit acquis (67). L'IgM peut également interagir avec les plaquettes et être à l'origine de thrombopathies acquises (66).

Cryoglobulinémie de type I

La cryoglobuline de type I correspond à la présence d'une immunoglobuline monoclonale sérique qui précipite à une température inférieure à 37°C. Les isotypes les plus fréquents étant les IgM et IgG alors que les IgA sont plutôt rares. Cette cryoglobuline est retrouvée dans de nombreux syndromes lymphoprolifératifs dont la MW et le MM. Le mécanisme de précipitation de l'Ig monoclonale se déclenche lors d'une baisse de la température, ceci entraînant une modification de sa conformation et favorisant son auto-association (68). Une cryoglobuline est identifiée dans 20% des cas de MW, néanmoins, moins de 5% de ces patients seront symptomatiques : syndrome de Raynaud, ulcères cutanés, arthralgies, purpura, acrocyanose et nécrose des régions les plus exposées au froid, comme le bout du nez, les oreilles, les doigts et les orteils (Figure 15) (19,60,69).



Figure 15 : Cryoglobulinémie se manifestant par une acrocyanose sévère chez un patient atteint de MW avant (A) et après (B) réchauffement et plasmaphérèse, d'après *Treon et al.* (19).

Amylose et autres maladies de dépôt

L'IgM monoclonale sécrétée par la population lymphoplasmocytaire a également la capacité à se déposer sur divers organes. Sur la peau, elle forme des papules et nodules cutanés qualifiés de « macroglobulinémiques ». On peut aussi retrouver des dépôts au niveau du tractus digestif responsables de diarrhées et de malabsorption mais également au niveau rénal avec une atteinte glomérulaire (60,69). Plus rarement, la MW peut s'accompagner d'une amylose AL (ou amylose à chaîne légère d'immunoglobuline), l'étude de *Gertz et al.* en 2003

a rapporté que 2.2% des patients possédant une IgM monoclonale sérique présentaient une amylose AL systémique primitive, parmi eux, 21% avait une MW (70).

I.1.5.3.2. Manifestations liées aux propriétés antigéniques de l'IgM

Neuropathie périphérique liée à l'IgM

La neuropathie périphérique est une manifestation clinique fréquemment rencontrée chez les sujets atteints de M-MGUS et MW puisque rapportée dans 15 à 30% des cas (71). Il s'agit d'atteintes des nerfs crâniens, de polyneuropathies symétriques, de mono- ou multineuropathies. Les mécanismes à l'origine de ces neuropathies sont multiples et complexes. L'IgM monoclonale est à la base de ces processus dans 2/3 des cas, en effet, son activité autoanticorps est dirigée contre les antigènes du système nerveux périphérique. La polyneuropathie chronique et symétrique à anticorps anti-MAG (*Myelin Associated Glycoprotein*) représente la moitié des cas des neuropathies des sujets MW, ici, l'activité de l'IgM est dirigée contre la gaine de myéline des fibres nerveuses. D'autres activités anticorps existent, elles sont par exemple dirigées contre le sulfatide, la chondroïtine sulfate C, les protéines du cytosquelette et les gangliosides tels que GM1 ± GD1b, GQ1b, GD1 (60). En outre, l'activité de l'IgM ne peut être mise en évidence avec les antigènes répertoriés dans 30% des cas (71).

Anémie hémolytique à agglutinine froide

L'anémie hémolytique qui se manifeste dans 10 à 15% des cas de MW est de nature auto-immune (69). L'IgM monoclonale agit comme un auto-anticorps dirigé contre un antigène de surface des érythrocytes. Les antigènes érythrocytaires du système Li, précurseurs des groupes sanguins ABH et Lewis, sont fréquemment impliqués. Les globules rouges, dès lors sensibilisés par l'IgM, seront détruits via le système du complément. On parle d'agglutinines froides car l'hémolyse survient à des températures inférieures à 37°C.

Cryoglobulinémie de type II

Les cryoglobulines de type II sont constituées de deux isotypes d'Ig : une Ig monoclonale à activité facteur rhumatoïde (FR) qui, le plus souvent, est une IgM et une Ig polyclonale, généralement une IgG, qui se comporte comme un antigène du facteur rhumatoïde IgM. L'IgM à activité FR possède une affinité accrue pour les IgG, l'interaction à froid de ces deux Ig génère un cryoprécipité pouvant être à l'origine de vascularites des petits vaisseaux (60,68). 20% des sujets atteints de MW présentent une cryoglobulinémie de type II, de façon similaire à la cryoglobulinémie de type I, peu d'entre eux sont symptomatiques (60,69).

I.1.6. Diagnostic biologique

I.1.6.1. Immunochimie : électrophorèse des protéines sériques

La découverte fortuite d'un pic monoclonal IgM à l'électrophorèse des protéines sériques constitue le plus souvent le premier élément diagnostique de la MW. L'immunofixation sérique

assure l'identification de la protéine monoclonale : la chaîne légère associée est κ dans 75 à 80% des cas (19). La concentration sérique de cette immunoglobuline est variable selon les sujets et peut être utile pour suivre la progression de la maladie ou l'efficacité du traitement. Une attention particulière doit être attribuée à la présence d'agglutinines froides ou de cryoglobulines susceptibles d'affecter ce titre et dont la recherche doit être effectuée d'emblée. L'électrophorèse urinaire et la caractérisation d'une éventuelle protéinurie de Bence Jones doit être réalisée, bien qu'elle ne soit présente que dans 3% des cas et qu'elle ne dépasse rarement 1g/24h (19).

I.1.6.2. Hémogramme

L'hémogramme peut être normal au diagnostic mais l'anomalie la plus courante est l'anémie. De profondeur variable, elle constitue un motif de consultation et fait partie des critères de traitement de la maladie.

Une thrombopénie est rarement observée, elle peut être secondaire à l'infiltration médullaire, à l'hypersplénisme ou encore des mécanismes auto-immuns par fixation de l'IgM monoclonale à la surface des plaquettes (72).

Une leuco-neutropénie modérée associée à une lymphocytose est possible, de même qu'un tableau pancytopénique pour les formes symptomatiques. On peut également noter la présence de rouleaux érythrocytaires (liés à l'IgM et susceptibles d'induire une fausse macrocytose) et de lymphoplasmocytes au frottis sanguin (72).

I.1.6.3. Myélogramme et biopsie ostéomédullaire

La biopsie ostéo-médullaire (BOM) est essentielle au diagnostic de la MW car elle permet une meilleure quantification de l'infiltration de la moelle qu'une simple aspiration mais elle demeure un geste invasif. Dans certains cas, la réalisation d'un myélogramme associé à un immunophénotypage peuvent être suffisants lorsque la BOM n'est pas possible, notamment chez les sujets âgés (âge médian au diagnostic : 70 ans), en cas de refus du patient ou lorsqu'aucun traitement n'est envisagé (69). L'infiltration de la moelle osseuse est classiquement diffuse, interstitielle ou nodulaire, avec un schéma intertrabéculaire (Figure 16). Un schéma d'infiltration exclusivement paratrabéculaire est inhabituel et doit faire évoquer un lymphome folliculaire (19,72). Dans la MW, on observe une population cellulaire constituée d'un *continuum* de différenciation lymphoplasmocytaire avec : des lymphocytes matures, des lymphoplasmocytes à différenciation plasmocytaires ou plasmacytoïdes et des plasmocytes (69). Il est également possible d'observer des inclusions intranucléaires volumineuses et translucides ou corps de Dutcher-Fahey, constitués de dépôts de l'IgM monoclonale (19). La présence de mastocytes dans le microenvironnement de la moelle osseuse est observée dans $\frac{1}{4}$ des cas, le plus souvent au niveau d'amas lymphoïdes. Leur présence peut aider à différencier la MW des autres lymphomes (19,69,72).

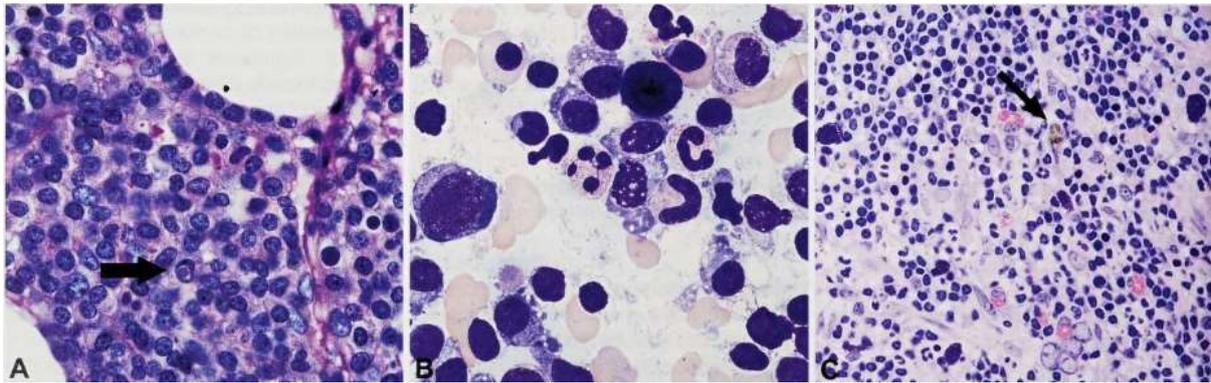


Figure 16 : Lymphome lymphoplasmocytaire, d'après *Swerdlow et al.* (3).

A) La biopsie ostéo-médullaire montre une infiltration lymphoplasmocytaire avec des corps de Dutcher (désignés par la flèche) positive à la coloration PAS (Periodic Acid-Schiff). B) L'infiltrat lymphoplasmocytaire est aussi observé sur la ponction médullaire. C) La coloration de Giemsa met en évidence l'augmentation caractéristique des mastocytes et de l'hémosidérine dans la MW (désignés par la flèche).

Devant la suspicion d'une localisation extra-médullaire, des prélèvements au niveau des sites concernés peuvent permettre de révéler l'infiltration lymphomateuse. Par exemple, une biopsie ganglionnaire peut être réalisée en cas d'adénopathies (Figure 17).

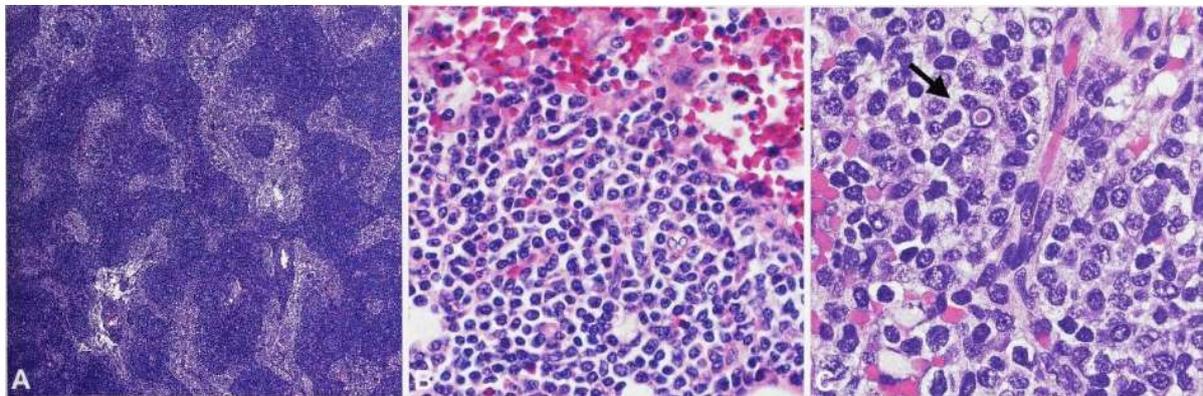


Figure 17 : Biopsie ganglionnaire d'un patient atteint de MW, d'après *Swerdlow et al.* (3)

A) Infiltration sinusale massive et présence de lymphoplasmocytes d'aspect monotone dans les régions intersinuales B) Aspect monotone typique des lymphocytes, des lymphocytes plasmacytoïdes et des plasmocytes dans la partie adjacente d'un sinus. C) Un corps de Dutcher (désigné par la flèche) mis en évidence par une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine.

I.1.6.4. Immunophénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) joue un rôle primordial dans le diagnostic de la MW. Le principe technologique est brièvement rappelé en Annexe 2. Le matériel biologique de choix pour cette analyse est la moelle osseuse, qui reste le point de départ de la maladie et donc l'organe le

plus fréquemment infiltré. Le sang en revanche, n'est pas ou peu utilisé au vue de la rareté des phases leucémiques. D'autres prélèvements comme la ponction ganglionnaire, le LCR, ... en cas d'atteinte extra-médullaire peuvent être analysés.

Dans la MW, qui se définit comme un *continuum* de différenciation lymphoplasmocytaire, les cellules tumorales peuvent être identifiées dans les deux compartiments cellulaires : lymphocytaire B et plasmocytaire (Figure 18).

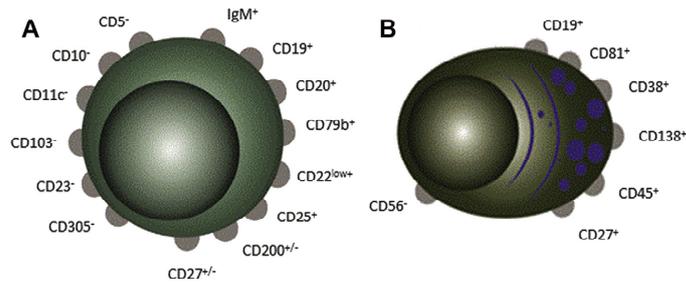


Figure 18 : Immunophénotype du clone MW : (A) Lymphocytes B tumoraux (B) Plasmocytes tumoraux, d'après Gascue *et al.* (73)

Les cellules tumorales de la MW se caractérisent par l'expression en surface des marqueurs lymphocytaires B : CD19, CD20 et CD22 avec un niveau d'expression similaire aux cellules B matures saines pour le CD19 et le CD20 et plus faible pour le CD22. On retrouve une expression de l'IgM et de sa chaîne légère κ ou λ (majoritairement κ). Le CD5 et le CD23 sont détectés chez moins de 20% des sujets MW et le CD38 est positif chez la moitié des MW même si le niveau d'expression est plus faible que celui des progéniteurs B et des plasmocytes normaux. Le CD25 est exprimé de façon homogène alors que le CD27, marqueur des lymphocytes B mémoire, peut être faiblement à très fortement exprimé. A la différence de la leucémie à tricholeucocytes, le CD103 et le CD11c sont absents. En outre, les marqueurs CD79b, CD81, CD24, HLA-DR et BCL2 sont très souvent positifs. Les principaux caractères de l'immunophénotype lymphocytaire B monotypique sont résumés dans le Tableau 1 (73).

Tableau 1 : Différences immunophénotypiques entre lymphocyte B normal et cellule monotypique de MW, d'après *Gascue et al.*

Niveau d'expression de l'antigène : + : positif ; ++, positif fort ; - : négatif ; ± positif ou négatif selon les cas (73)

Antigène	Lymphocyte B normal	Lymphocyte B monotypique MW
CD19	++	++
CD20	++	++
CD22	++	+
CD10	-	-
CD5	-	±
CD23	-	±
CD25	±	+
CD27	±	±
CD38	±	±

Le score de Matutes résumé dans le Tableau 2 ci-dessous, dédié au diagnostic de la LLC (score à 4 ou 5), est le plus souvent inférieur à 3 dans la MW (74).

Tableau 2 : Score de Matutes

Cotation	1	0
CD5	+	-
CD23	+	-
Expression Ig monotypique	Faible	Forte
FMC7	-	+
CD79b/CD22	Faible	Forte

C'est donc l'interprétation des différents marqueurs associée à la cytologie médullaire qui permet de poser le diagnostic de MW. Toutefois, l'équipe de *Paiva et al.* (74) a décrit en 2014 un phénotype caractéristique de la MW en étudiant le profil de 244 patients au diagnostic (cohorte constituée de sujets atteints de MW, sMW et M-MGUS). Le phénotype majoritaire retrouvé était le suivant : CD22Faible, CD23-, CD25+, CD27+, IgM+. Dans cette étude, il n'a pas été retrouvé d'expression des marqueurs CD5, CD10, CD11c et CD103, à la différence des autres syndromes lymphoprolifératifs.

L'immunophénotype des plasmocytes monotypiques dans la MW a été très peu étudié et semble très proche de celui des plasmocytes normaux. Concernant les marqueurs pancellulaires B, le CD19 est positif dans la plupart des cas alors que le CD20 est négatif (73). On retrouve également l'expression de l'IgM, la chaîne légères κ ou λ retrouvée est la même que dans la population monotypique lymphocytaire. Comme pour les plasmocytes sains, la population monotypique de la MW exprime le CD38 et le CD138. Le CD56 est plus spécifiquement exprimé à la surface des plasmocytes tumoraux de myélome (MM) et absent des plasmocytes normaux et des plasmocytes de MW (73).

I.1.6.5. Biologie moléculaire

La recherche de la mutation *MYD88* L265P sur prélèvement médullaire est recommandée dans le diagnostic et l'évaluation initiale de la MW (4,72). Elle peut également être recherchée sur des prélèvements d'origine extra-médullaire. En effet, la présence de la mutation *MYD88* L265P dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) peut aider à porter le diagnostic de syndrome de Bing Neel (75). De même, la positivité dans un liquide pleural a permis de relier l'épanchement pleural à la MW (76).

Parmi les patients atteints de MW, 80 à 90% présentent la mutation *MYD88* L265P selon les séries (31,35). Les sujets non mutés pour *MYD88* (*MYD88*^{WT} pour *Wild Type*) présentent généralement une infiltration médullaire et des taux d'IgM plus faibles que les sujets mutés (*MYD88*^{L265P}). Malgré tout, la survie globale des patients *MYD88*^{WT} est plus faible avec une mortalité 10 fois plus élevée que dans le groupe *MYD88*^{L265P} (77). Si la mutation *MYD88* L265P est à ce jour reconnue dans le diagnostic de la MW, il n'existe pas de méthode de référence pour sa détection. De nombreuses techniques sont actuellement utilisées : PCR en temps réel, PCR avec digestion enzymatique, PCR spécifique d'allèle, séquençage haut débit... (31,33,35,38,77,78). La technique doit cependant être suffisamment sensible pour permettre la détection de la mutation dans des prélèvements parfois très faiblement infiltrés. De plus, la mutation L265P de *MYD88* n'est pas la seule répertoriée, c'est pourquoi la recherche par technique Sanger ou par séquençage haut débit serait judicieusement appliquée en l'absence de positivité L265P (72).

La recherche d'une mutation du gène *CXCR4* par des techniques moléculaires (PCR spécifique d'allèle, séquençage haut débit) n'est actuellement pas recommandé dans le diagnostic de la MW (79).

I.1.6.6. Cytogénétique

Aucune recommandation n'a été établie concernant l'indication d'une analyse cytogénétique (caryotype et hybridation *in situ* en fluorescence ou FISH) dans la MW. La réalisation de cet examen est cependant utile, au diagnostic notamment, afin d'éliminer d'autres hémopathies. Il n'existe pas d'anomalies récurrentes dans la MW, cependant la présence d'une trisomie 4 est très en faveur d'une MW (56).

I.1.6.7. Biochimie

Lors du diagnostic de la MW, la présence de l'IgM monoclonale est susceptible d'entraîner une hyperprotéinémie ainsi qu'une augmentation de la vitesse de sédimentation. Il est intéressant de déterminer le taux sérique de β 2-microglobuline, qui peut être utilisé, en l'absence d'insuffisance rénale, dans le score pronostique IPSSWM (*International Prognostic Scoring System for Waldenström Macroglobulinemia*) (72,80).

I.1.6.8. Auto-immunité

La recherche d'anticorps anti-MAG par technique ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) peut être réalisée en cas de suspicion de polyneuropathie associée à la gammopathie monoclonale.

I.1.7. Diagnostics différentiels

La présence d'une infiltration lymphoplasmocytaire médullaire et/ou d'une IgM monoclonale sérique ne sont pas pathognomoniques de la MW et peuvent être observées dans d'autres troubles lymphoprolifératifs tels que le LZM et la LLC. L'histologie et la cytologie médullaire, l'immunophénotypage par cytométrie en flux, la biologie moléculaire et la cytogénétique construisent le faisceau d'arguments nécessaire au diagnostic différentiel entre MW et autres syndromes lymphoprolifératifs ainsi qu'entre MW et phases précoces de la maladie (M-MGUS et *smoldering* MW).

I.1.7.1. MW et phases précoces de la maladie (M-MGUS et sMW)

La M-MGUS constitue le principal diagnostic différentiel de la MW. Il se définit comme un stade « pré-Waldenström » avec une probabilité de progression estimée à 1.5% par an (10). Les patients, asymptomatiques, possèdent une IgM monoclonale sérique mais une infiltration lymphoplasmocytaire médullaire inférieure à 10%. La mutation *MYD88* L265P est présente dans 50 à 80% des cas (32,33).

Une entité proche du M-MGUS a été décrite dans le second *Workshop* International de la MW (4), il s'agit de l'*IgM-related disorder* ou troubles associés à l'IgM (Figure 19). Elle répond aux critères diagnostiques de la M-MGUS et ne présente pas de signes généraux ou de symptômes liés à l'infiltration tumorale. Cependant des désordres liés à l'IgM sont remarquables comme l'anémie hémolytique liée à une agglutinine froide, la cryoglobuline de type II ou la neuropathie périphérique (81–83).

Enfin, la sMW, MW « *smoldering* » ou forme indolente répond aux critères de la MW à la seule différence qu'elle est asymptomatique. Les critères cardinaux de classement du stade M-MGUS vers MW sont repris dans la Figure 19.

Table 1. Classification of WM and Related Disorders				
	IgM Monoclonal Protein*	Bone Marrow Infiltration†	Symptoms Attributable to IgM	Symptoms Attributable to Tumor Infiltration‡
WM				
Symptomatic	+	+	+	+
Asymptomatic	+	+	-	-
IgM-related disorders‡	+	-(b)	+	-
MGUS	+	-(b)	-	-

* The panel considered it to be inappropriate to define an IgM concentration to distinguish MGUS from WM. However, it is important to note that the IgM concentration rarely if ever exceeds 3 g/dL in MGUS.

† Patients with unequivocal bone marrow infiltration by lymphoplasmacytic lymphoma will be considered to have WM, while patients without evidence of infiltration will be considered to have MGUS. However, it is acknowledged that in some patients equivocal evidence of bone marrow infiltration is demonstrable. This may be manifest in a number of ways and includes the detection of clonal B-cells by flow cytometry or polymerase chain reaction in the absence of morphological evidence of bone marrow infiltration. Alternatively, patients may have equivocal bone marrow infiltrates without confirmatory phenotypic studies. It is considered that these patients should be classified as MGUS until further data become available.

‡ It is well recognized that a population of patients exist who have symptoms attributable to the IgM monoclonal protein but no overt evidence of lymphoma. Such patients may present with symptomatic cryoglobulinemia, amyloidosis, or autoimmune phenomena such as peripheral neuropathy and cold agglutinin disease. It is appropriate to consider these patients as a clinically distinct group and the term "IgM-related disorders" is proposed.

§ Symptoms attributable to tumor infiltration will include any of the following manifestations: constitutional symptoms, cytopenia(s), or organomegaly.

Figure 19 : Classification de la MW et des troubles liés à l'IgM (4)

I.1.7.2. Lymphome de la zone marginale (LZM)

Le LZM est une entité très proche de la MW. Cependant, son profil immunophénotypique peut permettre de le distinguer de la MW. En effet, les marqueurs CD22 et CD11c sont surexprimés dans le LZM (expression forte dans 48% et 39% des cas, respectivement) et absents dans la MW. Le CD180 est également fréquemment surexprimé par les cellules de LZM et d'expression faible dans la MW (84), et enfin le CD103, négatif dans la MW, était exprimé dans 40% des LZM (85). Le CD25 est peu spécifique puisque retrouvé dans 88% des MW et 40% des LZM (85).

En cytogénétique, l'anomalie la plus fréquente des LZM est la délétion 7q21 mais elle est peu spécifique (60,86).

Sur le plan moléculaire, la mutation *MYD88* L265P n'est que rarement observée dans les LZM (environ 5% des cas) et reste donc très en faveur d'un LPL/MW lorsqu'elle est retrouvée (33,38). Les principales clés diagnostiques entre LZM et LPL/MW sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Table comparative des clés diagnostiques entre lymphome de la zone marginale et lymphome lymphoplasmocytaire/macroglobulinémie de Waldenström

Marqueur	Lymphome de la zone marginale (LZM)	Lymphome lymphoplasmocytaire / Macroglobulinémie de Waldenström (LPL/MW)
CD22	+	-
CD11c	+	-
CD180	+/-	-
CD103	-/+ (40%)	-
CD25	-/+ (40%)	+/- (88%)
Trisomie 4	-	-/+ (rare : 8%)
MYD88^{L265P}	- à -/+ (5%)	+ à +/- (90%)

I.1.7.3. Leucémie lymphoïde chronique

Après la MW, la LLC est le deuxième LNH-B pouvant être accompagné d'un pic IgM monoclonal sérique (32,87). La LLC est caractérisée par une phase leucémique >5G/L constituée de petits lymphocytes mûrs. Une différenciation lymphoplasmocytaire peut être observée dans un faible nombre de cas (32,87). Il existe également une forme essentiellement ganglionnaire de la LLC où la phase leucémique est <5G/L voire négative (*i.e.* lymphome lymphocytaire ou SLL pour *small lymphocytic lymphoma*) parfois difficile à distinguer de la lymphocytose B monoclonale (MBL pour *monoclonal B-cell lymphocytosis*), phase précédant l'apparition d'une LLC (risque d'évolution de 1%/an), sans adénopathie et avec un clone B <5G/L dans le sang circulant.

Ici, l'immunophénotypage et le calcul du score de Matutes sont essentiels pour faire le diagnostic d'un clone de type LLC. En effet, les cellules de LLC expriment le CD5 et le CD23 et présentent une faible expression des immunoglobulines de surface lui conférant un score de Matutes ≥ 4 (Tableau 2) (86). Il n'y a pas d'anomalie cytogénétique suffisamment spécifique de la LLC pour aider au diagnostic d'entité (88) et la mutation *MYD88* L265P est très rarement observée (environ 5% des cas), préférentiellement chez des patients plus jeunes avec un excellent pronostic (32,87,89).

I.1.7.4. Myélome multiple à IgM

Le myélome à IgM est une entité très rare et sans mutation de *MYD88* (89). A la différence de la MW, le myélome multiple à IgM présente une infiltration médullaire purement plasmocytaire et lorsqu'il est symptomatique, il peut associer la présence de lésions ostéolytiques et une insuffisance rénale. Les plasmocytes tumoraux de myélome n'expriment que rarement le CD20 et sont majoritairement CD19- et CD56+. La translocation t(11;14)(q13;q32) est assez fréquente dans les myélomes à IgM (60,86).

I.1.8. Evolution – Complications

La décompensation cardiaque est une des complications de la MW, elle se manifeste en cas d'hyperviscosité et d'anémie chez l'insuffisant cardiaque principalement (19). Plus rarement, une amylose AL à IgM peut survenir, cette entité représente environ 7% des toutes les formes d'amylose (72,90) et la mutation *MYD88* L265P est présente dans 71% des cas (91). De plus, une dissémination extra-médullaire (92), une transformation en LNH agressif type DLBCL (3,93) ou encore l'apparition de syndromes myélodysplasiques ou de leucémies aigües peuvent également compliquer la MW (94).

I.1.9. Prise en charge symptomatique et/ou spécifique de la MW

I.1.9.1. Indications de traitement

La MW est un lymphome indolent incurable, seules les formes symptomatiques bénéficieront d'une prise en charge thérapeutique. En effet, aucun intérêt n'a été apporté par le traitement chez les patients asymptomatiques (M-MGUS et sMW), pour qui une surveillance clinique régulière (tous les 3 à 6 mois) ou stratégie « *watch and wait* » sera appliquée (95).

Les critères d'initiation d'un traitement ont été définis lors du second *Workshop* International de la MW (96) et sont les suivants :

- Critères cliniques :
 - Signes généraux : fièvre, sueurs nocturnes, altération de l'état général
 - Symptômes liés à l'IgM : syndrome d'hyperviscosité, neuropathie périphérique
 - Adénopathie symptomatique ou volumineuse (≥ 5 cm de diamètre)
 - Hépatomégalie ou splénomégalie symptomatique
 - Organomégalie symptomatique ou localisation extra-médullaire
- Critères biologiques :
 - Anémie ≤ 10 g/dL

- Thrombopénie ≤ 100 G/L
- Activité délétère de l'IgM : cryoglobuline symptomatique, anémie à agglutinine froide ou auto-immune, thrombopénie auto-immune, néphropathie, amylose AL

Le taux d'IgM sérique ne fait pas partie des critères thérapeutiques, mais un syndrome d'hyperviscosité doit être évoqué lorsque les taux sont élevés et un fond d'œil doit être réalisé.

I.1.9.2. Thérapeutique

La MW étant une maladie à faible fréquence dans la population générale, il n'existe pas de schéma thérapeutique standard. Cependant des recommandations émanant de réunions d'experts sont mises à disposition (78,97).

I.1.9.2.1. Traitement symptomatique

Dans les syndromes d'hyperviscosité et les formes sévères des agglutinines froides, la plasmaphérèse est à instaurer rapidement. En général, 2 à 3 séances de plasmaphérèse réduisent les taux d'IgM monoclonale sérique de 30 à 60%. Les transfusions de culots globulaires, si elles sont nécessaires, doivent être réalisées après plasmaphérèse pour ne pas aggraver l'hyperviscosité (97).

I.1.9.2.2. Traitement de première ligne

Anti-CD20

Le rituximab (R) constitue la première option thérapeutique de la MW. Cet anticorps monoclonal chimérique est dirigé contre la molécule de surface CD20 exprimé par les lymphocytes monotypiques. Utilisé en monothérapie, et généralement bien toléré, il doit être réservé aux formes peu symptomatiques ne nécessitant pas de contrôle rapide de la maladie (78). Son activité est retardée avec une efficacité maximale à 7 mois, délai qui doit être pris en compte pour l'évaluation de la réponse thérapeutique (98). Fait important, la présence d'un syndrome d'hyperviscosité sans plasmaphérèse préalable contre-indique l'administration de rituximab en raison d'une augmentation rituximab-induite de l'IgM sérique qui survient dans 40 à 60% des cas (97). En cas d'intolérance au rituximab, l'ofatumumab, un anticorps monoclonal anti-CD20 humain (IgG1) qui se lie spécifiquement à un épitope différent du rituximab a montré son efficacité (99).

Agents alkylants

Les agents alkylants peuvent être utilisés en première ligne dans la MW notamment chez les sujets âgés où le rituximab présente une certaine toxicité. Le chlorambucil appartient à cette famille et induit une réponse thérapeutique dans 70 à 80% des cas chez le patient âgé (100).

Il peut également constituer une alternative au rituximab pour les patients présentant un syndrome d'hyperviscosité et pour qui la plasmaphérèse est contre-indiquée (en raison de comorbidités notamment).

Associations à base de rituximab

Pour les formes symptomatiques de la MW nécessitant un contrôle rapide de la maladie, l'association du rituximab avec un ou plusieurs agents alkylants constitue le traitement de première intention (79,101). Les combinaisons R-bendamustine et R-cyclophosphamide-dexaméthasone (DRC) présentent une bonne efficacité (79).

Inhibiteurs du protéasome

Les inhibiteurs du protéasome tel que le bortézomib, efficaces sur les cellules myélomateuses, peuvent être utilisés dans la MW puisqu'elle possède également une composante plasmocytaire. L'association R-bortézomib-dexaméthasone (BDR) permet d'obtenir jusqu'à 85% de réponse (102), mais le principal effet indésirable est l'apparition d'une neuropathie périphérique. Le carfilzomib, inhibiteur du protéasome de seconde génération, est associé à un plus faible risque de neurotoxicité et a également démontré son efficacité en association avec le rituximab et la dexaméthasone chez les patients atteints de MW (103).

I.1.9.2.3. Traitement des récives et des formes réfractaires

Lors d'une rechute ou d'une MW réfractaire, l'utilisation d'une autre molécule préconisée en première intention est envisageable. La même molécule peut être utilisée à nouveau si elle a permis une réponse d'un an ou plus. Toutefois, il est préférable d'éviter les lignes susceptibles d'endommager les cellules souches tels que les agents alkylants ou les analogues nucléosidiques si une greffe autologue de cellules souches hématopoïétiques est envisagée et préférer des molécules moins toxiques comme le rituximab (104).

L'évérolimus

L'évérolimus est un inhibiteur de mTOR, protagoniste de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR jouant un rôle dans la régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire. La mise en place de ce traitement doit être soigneusement évaluée car il existe un risque d'hyperviscosité à l'arrêt par effet rebond du taux d'IgM monoclonale et il expose à une forte toxicité pulmonaire. De plus, une forte toxicité hématologique est décrite avec des anémies (27% des cas) et des thrombopénies profondes (20%). Son utilisation est donc recommandée dans les formes réfractaires (79).

L'ibrutinib

Treon et al. (105) ont mis en évidence l'intérêt de l'utilisation de l'ibrutinib, ou inhibiteur de la BTK (Bruton Tyrosine Kinase) dans une étude prospective chez des sujets atteints de MW et ayant déjà reçu un traitement de première ligne. L'ibrutinib agit en inhibant le signal de

prolifération et de survie cellulaire induit par l'interaction MYD88-BTK (voie de signalisation NFκB). La présence de la mutation *MYD88* L265P rend ce complexe plus sensible à l'ibrutinib. Inversement, les sujets *MYD88* WT ne présentent pas de réponse majeure et un ORR inférieur (40,77). L'efficacité de cet inhibiteur peut aussi être affectée par des mutations du gène *CXCR4* avec de la même façon un ORR et des réponses majeures plus faibles. Des études précliniques ont établi qu'un inhibiteur spécifique de *CXCR4*, le plerixafor, serait susceptible de rétablir la sensibilité aux inhibiteurs de BTK (45,106). Actuellement, il est recommandé d'effectuer un dépistage du statut mutationnel de *MYD88* chez les sujets candidats à un traitement par ibrutinib (79). Concernant les mutations de *CXCR4*, des explorations supplémentaires doivent être effectuées afin de clarifier son impact sur le traitement. Néanmoins, les patients *MYD88* non muté et *CXCR4* muté répondant moins vite à l'ibrutinib, il pourrait être pertinent de rechercher les mutations de *CXCR4* avant traitement pour les patients très symptomatiques afin de leur proposer de débuter le traitement avec une drogue à efficacité plus immédiate (anti-CD20, agent alkylant, ...) (79).

I.1.9.3. Critères de réponse thérapeutique

Les critères de réponse au traitement dans la MW ne sont pas les mêmes que ceux utilisés pour les autres lymphomes indolents. Ceci est principalement dû au fait que le taux d'IgM monoclonale est pris en compte et que sa disparition complète à l'immunofixation signe la rémission complète. En raison des risques de variations inter-laboratoires, le dosage de cette IgM doit être réalisé dans le même centre et par la même technique (densitométrie ou néphélométrie). La classification des différents groupes de réponse thérapeutique adoptée lors du VIème *Workshop* International sur la MW est représentée dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Classification des réponses thérapeutiques dans la MW, d'après Owen *et al.* (107)

Type de réponse	Critères
Réponse complète	Absence de l'IgM monoclonale sérique à l'immunofixation Taux sérique d'IgM normal Disparition de tous les symptômes cliniques (organomégalies, signes neurologiques, etc.) Moelle osseuse cytologiquement normale
Très bonne réponse partielle	Diminution $\geq 90\%$ du taux d'IgM monoclonale par rapport à la première détermination Disparition complète des signes cliniques Aucun nouveau signe ou symptôme signant l'activité de la maladie
Réponse partielle	Diminution $\geq 50\%$ mais $< 90\%$ du taux d'IgM monoclonale par rapport à la première détermination Disparition complète des signes cliniques Aucun nouveau signe ou symptôme signant l'activité de la maladie
Réponse mineure	Diminution $\geq 25\%$ mais $< 50\%$ du taux d'IgM monoclonale par rapport à la première détermination Aucun nouveau signe ou symptôme signant l'activité de la maladie

La progression de la maladie se définit par une augmentation $> 25\%$ du taux d'IgM sérique par rapport au taux mesuré le plus bas et/ou l'apparition ou la progression de la symptomatologie clinique.

Néanmoins, il existe quelques discordances entre taux d'IgM et infiltration tumorale, notamment avec certains traitements dont le rituximab, l'évérolimus, le bortézomib et l'ibrutinib qui réduisent la masse tumorale sans modifier la quantité sérique en IgM. Le taux d'IgM monoclonale peut également être sous-estimé par la présence d'une cryoglobuline, le dosage doit alors être effectué dans des conditions optimales pour minimiser la cryoprécipitation. En cas d'incohérence entre le taux d'IgM et l'expression clinique de la maladie, une BOM peut être envisagée (97).

I.1.10. Facteurs pronostiques

Le score ISSWM ou *International Prognostic Scoring System for Waldenström Macroglobulinemia* (80) est un puissant score pronostique basé sur des critères cliniques et biologiques aisément accessibles qui permettent de classer les patients atteints de MW en trois groupes de risque (Tableau 5). Ces groupes ont un taux de survie à 5 ans allant de 86% pour le groupe à faible risque à 36% pour le groupe à haut risque. Les facteurs utilisés dans ce score sont les suivants (1 point par facteur) :

- Age ≥ 65 ans

- Autres facteurs de risque
 - Hémoglobine ≤ 11.5 g/dL
 - Plaquettes ≤ 100 G/L
 - $\beta 2$ microglobuline > 3 mg/L
 - IgM > 70 g/L

Tableau 5 : Index pronostique international (ISSWM) d'après *Buske et Leblond* (101)

Groupe de risque	Faible	Intermédiaire	Fort
Score	0-1 (sauf l'âge)	Age ou 2	≥ 3
Survie globale à 5 ans (%)	87	68	36

La médiane de survie est de 5 à 10 ans chez les sujets atteints de MW symptomatique (108) et de plus de 14 ans dans les formes indolentes ou *smoldering* (109). Ces derniers peuvent rester en abstention thérapeutique de nombreuses années. Le risque de progression vers la MW est plus élevé lors des 5 premières années après le diagnostic de sMW puis diminue jusqu'à atteindre un risque proche de celui des M-MGUS (109). Les localisations extra-médullaires de la MW ne semblent pas aggraver le pronostic contrairement au MM. En effet, la médiane de survie dans ce cas est de 79% à 10 ans, soit proche de celle des MW (92).

Un taux élevé de LDH est également péjoratif, surtout dans le groupe des patients à haut risque du score ISSWM (110). La présence de chaînes légères libres ou FLC (Free Light Chain) à des taux élevés a été remarquée chez des sujets MW symptomatiques ou présentant des facteurs de mauvais pronostic (aucun lien n'a été mis en évidence entre l'IgM monoclonale et la présence des FLC) (111,112). Enfin, l'absence de mutation L265P du gène *MYD88* a été associée à un mauvais pronostic (77).

II. Objectifs

Le diagnostic de MW reste encore délicat. Les diagnostics différentiels sont nombreux, les LZM par exemple peuvent présenter des degrés de différenciation lymphoplasmocytaires variables et un pic IgM. De plus, la mutation de *MYD88* n'est pas absolument spécifique de la MW puisque retrouvée aussi dans les LZM et la LLC à faible fréquence.

Depuis 2012, notre laboratoire a mis en place un immunophénotypage plasmocytaire (population CD38+/CD138+) en parallèle de l'immunophénotypage lymphocytaire devant toute exploration d'une IgM monoclonale.

L'objectif de notre équipe est d'évaluer l'apport de ce double immunophénotypage lymphocytaire et plasmocytaire dans le diagnostic de la MW et de compléter nos données avec l'exploration des mutations des gènes *MYD88* et *CXCR4* à des fins également diagnostiques, mais aussi pronostiques et thérapeutiques.

Le travail a été réalisé sur une cohorte de 84 patients ayant bénéficié d'un bilan au CHU de Limoges dans le cadre de l'exploration d'un pic monoclonal IgM entre 2012 et 2019. La relecture cytologique médullaire concertée a été réalisée conjointement à la réinterprétation du double immunophénotypage afin de classer au mieux les patients en MW, M-MGUS ou autres LNH. Le statut mutationnel de *MYD88* a été déterminé en routine alors que l'exploration des mutations de *CXCR4* par séquençage haut débit a été mise au point dans le cadre de cette étude.

Ce travail a également fait l'objet de deux communications orales accompagnées d'un poster au 39ème congrès de la Société Française d'Hématologie (SFH) au Palais des Congrès à Paris le 27 Mars 2019, ainsi qu'au 23ème congrès de l'Association Française de Cytométrie (AFC) au couvent des Jacobins à Rennes le 19 septembre 2019.

III. Matériel et Méthode

III.1. Patients

Selon la procédure institutionnelle de notre CHU, les patients peuvent choisir d'autoriser ou de s'opposer à l'utilisation des reliquats de leurs échantillons biologiques pour la recherche biomédicale. Les échantillons des patients non opposés sont alors requalifiés par le centre de ressource biologique CRBioLim et rendus disponibles pour des projets de recherche. Dans ce travail, l'utilisation des échantillons a fait l'objet d'une demande de session accordée auprès du CRBioLim.

Le recrutement des patients a été effectué par interrogation du système informatique de gestion de laboratoire (SIL) (logiciel Glims® distribué par la société MIPS, Belgique) utilisé au Centre de Biologie et de Recherche en Santé (CBRS) de Limoges. Le critère d'entrée dans la cohorte était la présence d'un pic monoclonal à IgM κ ou λ à l'électrophorèse des protéines sériques. Le diagramme de flux (CONSORT) de la sélection des sujets est détaillée à la Figure 20.

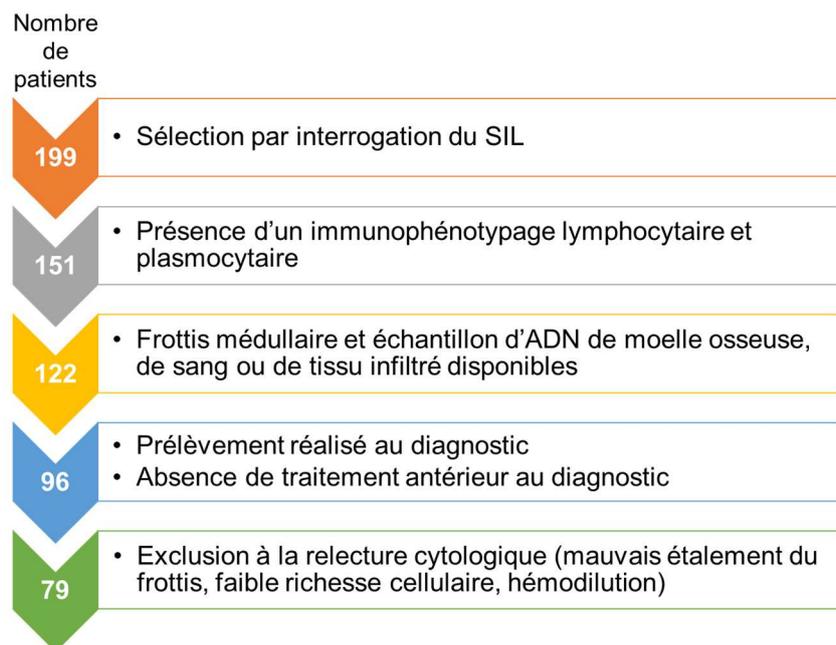


Figure 20 : Sélection des patients de la série

L'exhaustivité du recrutement a été vérifiée par une requête sur le SIL des sujets ayant bénéficiés d'une exploration de la mutation *MYD88*. Il est à noter que les explorations immunophénotypiques, cytologiques et moléculaires, ont été réalisées sur le même prélèvement de moelle. L'analyse moléculaire a été réalisée sur sang périphérique pour 10 patients et sur biopsie ganglionnaire pour 1 patient.

Afin d'évaluer la spécificité du phénotype des plasmocytes de MW, une cohorte randomisée de 30 patients atteints de myélome ayant bénéficié d'un immunophénotypage plasmocytaire ainsi que 5 patients atteints de LPL à IgA (n=1), LPL à IgG (n=2) et de MGUS à IgG (G-MGUS, n=2) ont été ajoutés à cette étude.

L'ensemble du panel d'analyse : cytologie, cytométrie et biologie moléculaire, a été réalisé au laboratoire du CHU de Limoges. Les diagnostics ont été revus pour établir un classement sans équivoque entre les différentes entités suivantes : MW, M-MGUS et LNH de bas grade.

III.2. Relecture cytologique médullaire

La relecture cytologique concertée a été réalisée par 3 biologistes à l'aide d'une grille de lecture présente en Annexe 1. La grille de lecture a été utilisée comme outil de standardisation de l'annotation des frottis.

III.3. Immunophénotypage lymphocytaire et plasmocytaire

Le principe de la technique d'analyse de cytométrie en flux est rappelé en Annexe 2. L'immunophénotypage a été réalisé sur des échantillons de moelle osseuse prélevés dans un tube héparinate de sodium sans gel séparateur ou un tube EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique) BD Vacutainer® (BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis). Deux panels ont été effectués pour chaque patient : un lymphocytaire et un plasmocytaire.

Le panel lymphocytaire correspond au panel utilisé en routine au laboratoire de Limoges pour l'exploration des lymphocytes B. Il se compose de deux mélanges d'anticorps représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6: Composition des mélanges d'anticorps pour le panel lymphocytaire

	FITC	PE	ECD	PE Cy5	PE Cy7	APC	APC A700	APC A750	PB	KO
Tube 1	Kappa	Lambda	4	19	2	5	8	3	20	45
Tube 2	FMC7	10	19	38	11c	79b	23	43	25	45

Le tube 1 est un tube d'orientation, il permet de cibler les lymphocytes B et d'évaluer l'expression des chaînes légères κ et λ . Le ratio κ/λ permet d'identifier la présence d'un clone B, si le ratio >5 il signe la présence d'un clone B κ , à l'inverse s'il est <0.5 il s'agit d'un clone B λ , entre ces deux valeurs aucun clone n'est retenu. Le second tube permet la caractérisation des lymphocytes B et le calcul du score de Matutes (Tableau 2).

Le panel plasmocytaire est celui utilisé en routine pour la recherche de myélome. Il se compose de trois mélanges d'anticorps présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7 : Composition des mélanges d'anticorps pour le panel plasmocytaire

	FITC	PE	ECD	PE Cy5	PE Cy7	PB
Tube 1	i-Kappa	i-Lambda	45	138	38	
Tube 2	38	138	45	19	56	20
Tube 3	36	117+34	45	138	38	

Le premier tube détermine l'expression intracytoplasmique des chaînes légères κ ou λ des plasmocytes, de la même façon que pour les lymphocytes, le ratio κ/λ indique la présence d'un clone plasmocytaire κ si le ratio >5 ou λ si le ratio <0.5 . Le second tube détermine l'expression du CD19 et du CD56 sur les plasmocytes et les lymphocytes. Le troisième tube permet la correction de l'hémodilution du prélèvement afin d'obtenir une quantification plasmocytaire exacte nécessaire au diagnostic de myélome (113).

Les anticorps monoclonaux utilisés sont fournis par la société Beckman Coulter™ (Fullerton, Californie, Etats-Unis). Les analyses ont été réalisées avec un cytomètre en flux 10 couleurs de type Navios™ et les données ont été retraitées avec le logiciel Kaluza® Flow Analysis Software version 1.2 (Beckman-Coulter, Fullerton, Californie, Etats-Unis).

Pour les deux panels, les données qualitatives ont été relevées manuellement après un rephenêtrage uniforme de tous les histogrammes, appliqué à l'ensemble des échantillons de la cohorte. Les items répertoriés étaient les suivants :

- Données qualitatives :
 - Présence/Absence de populations monotypiques et polytypiques
 - Nature de la chaîne légère associée à la monotypie : κ ou λ
 - Niveau d'expression de la chaîne légère (low, normal ou high)
 - Présence/Absence d'une double population monotypique
 - Présence/Absence d'une population monotypique sur le type cellulaire non ciblé par le panel (monotypie lymphocytaire observable dans le panel plasmocytaire) permettant un contrôle des résultats
 - Niveau d'expression des marqueurs du panel (négatif, low ou positif)
- Données quantitatives :
 - Nombres d'évènements
 - Pourcentages des populations
 - Intensité moyenne de fluorescence ou MFI

Les paramètres quantitatifs d'intérêt ont été réordonnés à l'aide d'un script R® (Annexe 3).

III.4. Revue diagnostique combinant cytologie et cytométrie

Un reclassement diagnostique a été effectué pour chaque patient de la cohorte en regard des critères définis par le second *Workshop* International de la MW(4), du seuil de 10% d'infiltration lymphocytaire médullaire (81,82,114) et de l'expression clinique de la maladie.

Afin d'évaluer le plus précisément possible le pourcentage de cellules lymphocytaires monotypiques infiltrant la moelle osseuse, les comptes cellulaires cytologiques et immunophénotypiques ont été confrontés. En pratique, nous avons rapporté le pourcentage médullaire de cellules monotypiques lymphocytaires parmi les lymphocytes totaux, mesuré en CMF, au pourcentage de lymphocytes médullaires décompté en cytologie (détail du calcul ci-dessous). Le seuil de 10% a été appliqué au résultat ainsi obtenu séparant les M-MGUS des MW.

$$\% \text{ lymphocytes clonaux dans la moelle} = \frac{\% \text{ de lymphocytes dans la moelle} \times \% \text{ lymphocytes clonaux parmi les lymphocytes médullaires}}{100}$$

Figure 21 : Calcul du pourcentage de lymphocytes tumoraux infiltrant la moelle osseuse

Enfin, la caractérisation de ces deux entités a été affinée grâce à l'analyse de la symptomatologie clinique. Les sujets M-MGUS ont été classés en deux catégories : les formes asymptomatiques (notées M-MGUS) et les formes exprimant une symptomatologie liée à l'IgM ou M-MGUS-IRD (81–83). De la même façon, les formes asymptomatiques sMW et symptomatiques (signes généraux, liés à l'infiltration tumorale ou à l'IgM monoclonale) de la MW ont été distinguées.

La démarche de reclassification diagnostique est représentée à la Figure 22.

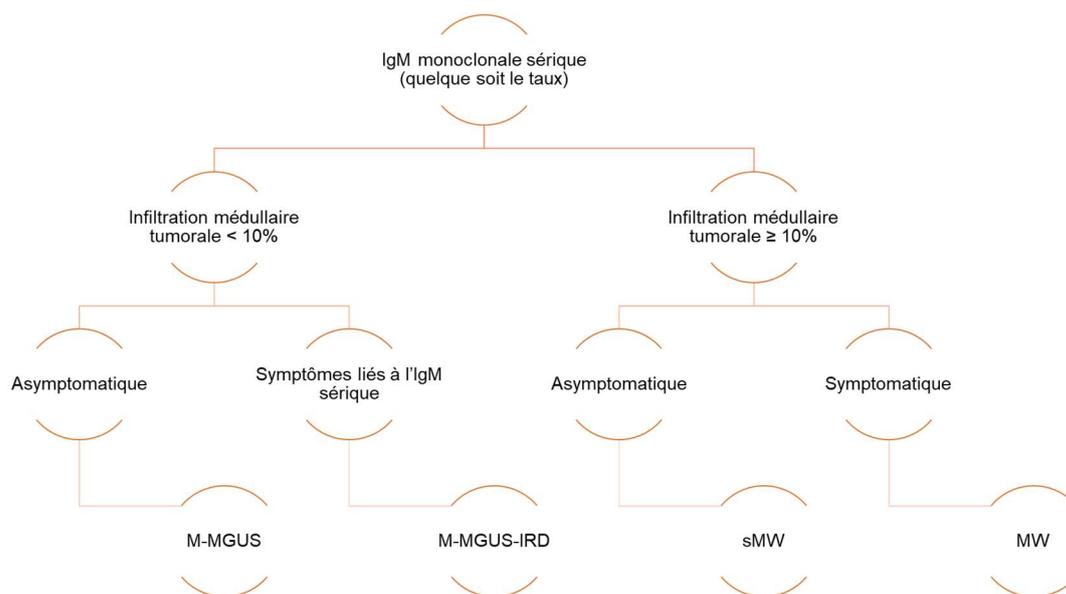


Figure 22 : Arbre décisionnel utilisé pour le reclassement diagnostique

III.5. Biologie moléculaire : exploration des mutations de *MYD88* et *CXCR4*

III.5.1. Extraction d'ADN

Les échantillons médullaires ont été prélevés dans un tube EDTA BD Vacutainer® (BD, Franklin Lakes, New Jersey, Etats-Unis). Après un pré-traitement par Ficoll® permettant la séparation de 5 millions cellules mononuclées, une extraction automatisée sur l'extracteur Maxwell RSC® Instrument (Promega, Madison, Wisconsin, Etats-Unis) ou manuelle à l'aide du kit QIAamp® DNA Blood mini (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) a été réalisée. Les extraits d'ADN obtenus ont été dosés avec un NanoDrop® ND-1000 (Ozyme, Saint-Cyr-L'École, France) puis congelés à -80°C.

Après décongélation, un contrôle du dosage d'ADN a été réalisé avec le fluoromètre Invitrogen™ Qubit™ 2.0 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) et le kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis).

Ces étapes ont été réalisées dans le respect des recommandations fournisseur.

III.5.2. Détermination du statut *MYD88*

III.5.2.1. PCR spécifique d'allèle *MYD88* L265P

Une PCR spécifique d'allèle ciblant la mutation *MYD88* L265P a été réalisée pour l'ensemble des échantillons à partir de l'ADN extrait. Les principes des méthodes de PCR et de PCR-AS (PCR spécifique d'allèle) sont rappelées en Annexe 4.

La PCR-AS *MYD88* L265P permet d'identifier la présence de la mutation et de caractériser son état, hétérozygote ou homozygote. La technique utilisée au laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges est inspirée de celle mise au point par *Varettoni et al.* en 2013 (33). Elle met en jeu une amorce antisens spécifique commune aux deux allèles (*MYD88* muté L265P et non muté WT) : 5'-AGGAGGCAGGGCAGAAGTA-3', et deux amorces sens spécifiques de la séquence L265P : 5'-GTGCCCATCAGAAGCGCC-3' d'une part et de la séquence WT : 5'-GTGCCCATCAGAAGCGCCT-3' d'autre part (Figure 23). Les deux amorces sens présentent un non-appariement en 3' (noté en rouge) afin d'empêcher l'amplification de l'amorce non appariée.



Figure 23 : Amorces spécifiques d'allèles de la PCR-AS *MYD88* L265P, d'après *Varettoni et al.* (33)

Le kit AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Buffer II and MgCl₂ (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) a été utilisé pour réaliser le mélange réactionnel (Tableau 8).

Tableau 8 : Composition du mix de la PCR-AS *MYD88* L265P

	Volume (μL)
Amorce <i>MYD88</i> -F-WT (10 μ M) ou Amorce <i>MYD88</i> -F-L265P (10 μ M)	1
Amorce <i>MYD88</i> -R (10 μ M)	1
dNTP (200 μ M)	1
TP 10X Applied Biosystem	5
MgCl ₂ Applied Biosystem	3
TAQ Gold Applied Biosystem	1
Eau nuclease-free	20
Dilution ADN à 5 ng/ μ L	18
Volume final	50

La réaction de PCR a été réalisée sur un thermocycleur SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) avec le programme qui figure au Tableau 9.

Tableau 9 : Programme d'amplification de la PCR-AS *MYD88* L265P

	Température	Durée
Dénaturation initiale	95°C	10 minutes
Amplification : 35 cycles	95°C	15 secondes
	60°C	30 secondes
	72°C	30 secondes
Elongation finale	72°C	5 minutes
Stockage final	12°C	Infini

Les résultats de la PCR-AS ont été révélés par migration électrophorétique sur l'automate MultiNa™ (Shimadzu, Kyoto, Japon) avec le kit DNA-500 Kit® (Shimadzu, Kyoto, Japon) selon les instructions du fournisseur.

Un témoin d'eau, un témoin négatif ainsi que deux témoins positifs, un hétérozygote et un homozygote mutés L265P, ont été passés à chaque cycle de migration.

Des mutations de *MYD88* autre que la L265P ont été décrites dans la MW (40). Ainsi, lorsqu'aucune mutation n'a été retrouvée avec la technique de PCR-AS, un séquençage Sanger a été réalisé afin de ne pas méconnaître l'existence d'une autre mutation de *MYD88*. D'autre part, s'il n'y avait pas d'amplification en PCR-AS, l'échantillon a également été vérifié en Sanger.

III.5.2.2. Séquençage Sanger du gène *MYD88*

Le principe de la méthode Sanger figure en Annexe 5. Le séquençage du domaine TIR du gène *MYD88* par cette méthode a été réalisé à l'aide des amorces suivantes (en rouge sur la Figure 24) :

- Amorces sens : 5'-TCTGACCACCACCTTGTG-3'
- Amorces antisens : 5'-AGGAGGCAGGGCAGAAGTA-3'

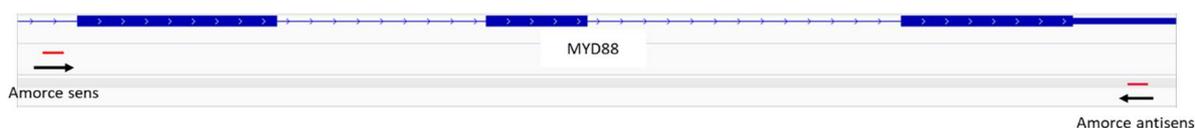


Figure 24 : Amorces spécifiques pour le séquençage Sanger du domaine TIR de *MYD88*

Les deux PCR Sanger ont été réalisées sur les thermocycleurs SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). Le kit Taq'Ozyme Purple Mix 2 (Ozyme, Saint-Cyr-L'École, France) a permis la réalisation de la première PCR d'amplification (la composition du mix et le programme utilisés figurent dans le Tableau 10 et le Tableau 11). La pureté des séquences a été vérifiée par migration électrophorétique à l'aide du Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Gene Co., Tokyo, Japon) puis elles ont subi un nettoyage enzymatique avec l'ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent Cycler (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis).

Tableau 10 : Composition du mix de la 1^{ère} PCR du séquençage Sanger

	Volume (µL)
Amorce sens	0.5
Amorce antisens	0.5
Taq'Ozyme Purple Mix 2	12.5
Eau nuclease-free	11
Dilution d'ADN à 50-100 ng/µL	0.5
Volume final	25

Tableau 11 : Programme d'amplification de la 1^{ère} PCR du séquençage Sanger

	Température	Durée
Dénaturation initiale	95°C	2 minutes
Amplification : 35 cycles	95°C	30 secondes
	59°C	30 secondes
	72°C	25 secondes
Elongation finale	72°C	5 minutes
Stockage final	12°C	Infini

Le kit BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) a été utilisé pour la seconde PCR (la composition du mix et le programme utilisés figurent dans le Tableau 12 et le Tableau 13) et le kit DyeEx® 2.0 Spin Kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) pour la purification des produits de PCR à séquencer.

Tableau 12 : Composition du mix de la 2^{ème} PCR du séquençage Sanger

	Volume (µL)
Produit de PCR amplifié	0.5
Amorce sens ou antisens	0.5
BigDye™ Terminator v1.1	2
Tampon de séquençage v1.1	3
Eau nuclease-free	14
Volume final	20

Tableau 13 : Programme d'amplification de la 2^{ème} PCR du séquençage Sanger

	Température	Durée
Dénaturation initiale	95°C	3 minutes
Amplification : 25 cycles	96°C	10 secondes
	55°C	5 secondes
	60°C	4 minutes
Stockage final	12°C	Infini

Le séquençage par méthode Sanger a été réalisé sur le séquenceur 3130xl Genetic Analyzer Hitachi Applied Biosystems (Hitachi, Chiyoda, Tokyo, Japon) par l'unité de séquençage du laboratoire du CHU de Limoges.

III.5.3. PCR spécifique d'allèle *CXCR4* S338X

La technique de PCR-AS utilisée permet la détection simultanée des mutations S338X c.C1013G et c.C1013A de *CXCR4*. Les amorces utilisées sont celles décrites par *Xu et al.* (48) (sur le supplément en ligne) (Figure 25) :

- Amorce sens : 5'-TTCCACTGTTGTCTGAACCCCATC-3'
- Amorces antisens (non-appariement en 3' en rouge)
 - Non mutée : 5'-AGACTCAGACTCAGTGGAAACAGTTG-3'.
 - C1013G : 5'-AGACTCAGACTCAGTGGAAACAGTTC-3'
 - C1013A : 5'-AGACTCAGACTCAGTGGAAACAGGTT-3'



Figure 25 : Amorces spécifiques d'allèles de la PCR-AS *CXCR4* S338X, d'après *Xu et al.* (48)

La réalisation de l'analyse est identique à celle de la PCR-AS *MYD88* L265P décrite en III.5.2.1., seule la composition du mix de PCR-AS diffère (Tableau 14).

Tableau 14 : Composition du mix de la PCR-AS *CXCR4* S338X

	Volume (µL)
Amorce <i>CXCR4</i> -F-WT (10 µM)	1
Amorce <i>CXCR4</i> -R-WT (10 µM) ou Amorce <i>CXCR4</i> -R-C1013G (10 µM) et Amorce <i>CXCR4</i> -R-C1013A (10 µM)	1
dNTP (200 µM)	4
TP 10X Applied Biosystem	5
MgCl ₂ Applied Biosystem	4
TAQ Gold Applied Biosystem	0.5
Eau nuclease-free	32.5
Dilution ADN à 50 ng/µL	5
Volume final	50

III.5.4. Séquençage du gène *CXCR4*

III.5.4.1. Préparation des bibliothèques

Les mutations de *CXCR4* retrouvées dans la MW concernent la partie C-terminale du gène et plus particulièrement les 40 derniers acides aminés (36). Deux couples d'amorces ont donc été créés afin de recouvrir la totalité de la zone d'intérêt :

- Cible 1 (en rouge sur la Figure 26)
 - Amorce sens PCR_1_F : TGGTGTCTGAACCCCATCCT
 - Amorce antisens PCR_1_R : GACATTCATCTGTTTCCACTGAGT
- Cible 2 (en bleu sur la Figure 26)
 - Amorce sens PCR_2_F : CAGCCTCAAGATCCTCTCCA
 - Amorce antisens PCR_2_R : ACACATTTTTTCAGATATAAAAGACTGACC

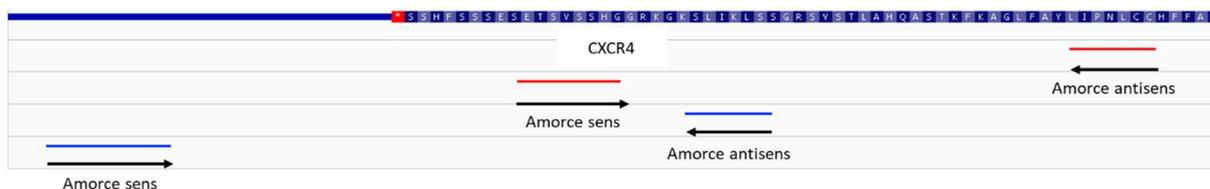


Figure 26 : Position des deux couples d'amorces dans la partie C-terminale de *CXCR4*

Le design a été réalisé à l'aide des outils en ligne suivants :

- <https://www.ensembl.org/index.html>
- <http://primer3.ut.ee/>
- <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Le logiciel GenXPPProfiler Beckman Coulter™ (Beckman-Coulter, Fullerton, Californie, Etats-Unis) disponible au laboratoire d'hématologie a également été utilisé. Les amorces ont été synthétisées par les laboratoires eurofins@Genomics (Eurofins Scientific, Luxembourg, Luxembourg). Les températures de fusion ou Tm (*Temperature of melting*) de chacune des amorces ont été déterminées à l'aide du site <https://tmcaculator.neb.com/#!/main>.

Un témoin d'eau a été mis en place pour la préparation des bibliothèques afin de s'assurer de l'absence de contamination. Incorporé au début de chaque manipulation, il a subi successivement toutes les étapes de PCR et de purification, de la même façon que les échantillons. Deux échantillons d'ADN non tumoraux ont servi de témoins négatifs.

III.5.4.1.1. PCR d'amplification des cibles *CXCR4*

La première PCR réalisée pour préparer le séquençage permet d'amplifier les deux cibles génomiques. Des séquences supplémentaires ont été ajoutées aux amorces PCR_1 et PCR_2 lors du *design*. Ces séquences (en rouge sur la Figure 27 et la Figure 28), vont se positionner à chaque extrémité du produit de PCR et permettre la liaison des adaptateurs lors de la prochaine étape.

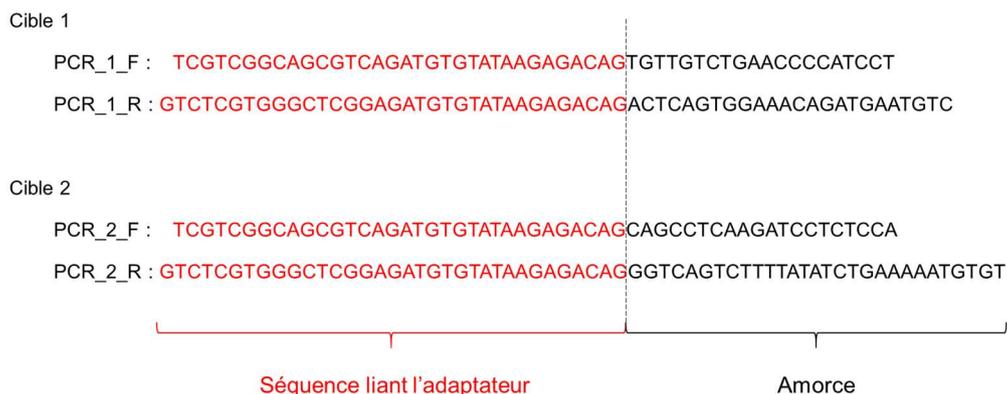


Figure 27 : Amorces de PCR des deux cibles de *CXCR4* avec la séquence de liaison à l'adaptateur

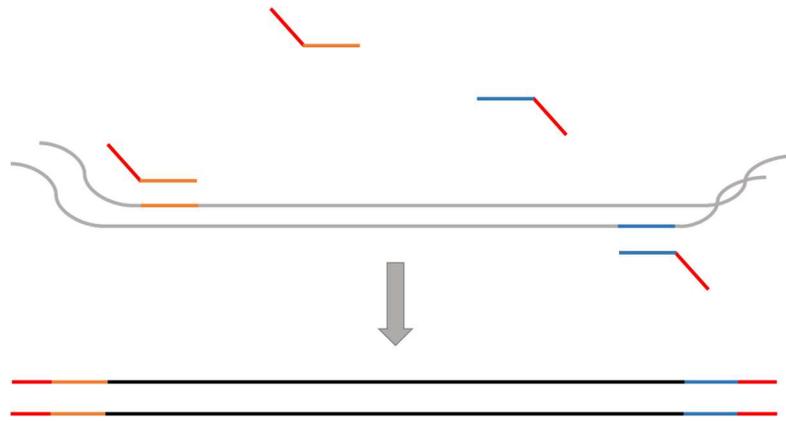


Figure 28 : PCR d'amplification des cibles *CXCR4*

L'ADN génomique est représenté en gris clair, les amorces spécifiques des séquences cibles en orange (sens) et bleu (antisens) ainsi que les séquences permettant la liaison aux adaptateurs en rouge. La réaction de PCR est représentée par la flèche grise. Les produits de PCR sont en noir, flanqués des amorces et séquences spécifiques.

La quantité d'ADN de départ utilisée était de 50 ng pour tous les échantillons. Le mix de PCR d'amplification figure dans le Tableau 15 et le kit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase M0530S (New England Biolabs® Inc., Ipswich, Massachusetts, États-Unis) utilisé contenait l'enzyme polymérase de haute-fidélité et le tampon de réaction.

Tableau 15 : Composition du mix de PCR d'amplification de *CXCR4*

	Volume (µL)
Tampon 5X Phusion HF	4
dNTP (10 mM)	0,4
Primer Forward (10 µM)	1
Primer Reverse (10 µM)	1
Phusion DNA Polymerase	0,2
Eau nuclease-free	8,4
Dilution d'ADN (10ng/µL)	5
Volume final	20

Le programme de PCR est reporté dans le Tableau 16, il a été réalisé sur un thermocycleur SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis).

Tableau 16 : Programme d'amplification de la 1^{ère} PCR de séquençage de *CXCR4*

	Température	Durée
Dénaturation initiale	98°C	30 secondes
Amplification : 35 cycles	98°C	10 secondes
	63°C	30 secondes
	72°C	15 secondes
Elongation finale	72°C	5 minutes
Stockage final	10°C	Infini

Les produits de PCR ont été purifiés par une technique de purification manuelle effectuée sur plaque magnétique DynaMag™ - 96 Side (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) avec le réactif HighPrep™ PCR Magbio® (Gaithersburg, Maryland, Etats-Unis) contenant les billes paramagnétiques. Les recommandations fournisseurs ont été respectées quant aux proportions de produits de PCR et de billes. L'ADN hautement purifié a été élué avec le tampon d'éluion Low TE Buffer Ion Torrent™ (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis).

III.5.4.1.2. PCR de liaison des adaptateurs Illumina®

Une fois les deux cibles amplifiées et purifiées, une seconde étape de PCR commune était nécessaire afin de fixer les adaptateurs spécifiques. Les adaptateurs, ou index Illumina® utilisés sont ceux du kit TG Nextera® XT Index Kit v2 (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis). Ils ont été modifiés afin d'apporter la séquence supplémentaire permettant la liaison aux produits de la première PCR « maison » et par conséquent synthétisés par les laboratoires eurofins®Genomics (Eurofins Scientific, Luxembourg, Luxembourg). Ces adaptateurs se composent des séquences initiant la réaction de séquençage en « bridge » et de codes à barres nécessaire à l'identification des échantillons. Nous avons à disposition 8 index i5 et 12 index i7, soit 96 combinaisons possibles. Ces adaptateurs possèdent également la séquence qui permettra à la l'ADN de se fixer sur la flow cell (Figure 29).

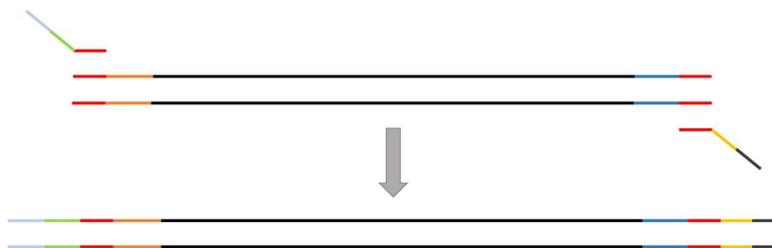


Figure 29 : PCR de liaison des adaptateurs Illumina®

Les adaptateurs sont composés de la séquence complémentaire, en rouge, permettant la reconnaissance des amplicons, des index (en vert et en jaune) avec leur codes à barres P5 (en bleu clair) et P7 (en gris foncé). Les produits de PCR sont en noir. La réaction de PCR est représentée par la flèche grise.

Le mix de PCR est présenté dans le Tableau 17, le kit utilisé est le même que lors de la première PCR : Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase M0530S (New England Biolabs® Inc., Ipswich, Massachusetts, États-Unis).

Tableau 17 : PCR de liaison des adaptateurs Illumina®

	Volume (µL)
Tampon 5X Phusion HF	5
dNTP (10 mM)	0.5
Primer Forward (10 µM)	1
Primer Reverse (10 µM)	1
Phusion DNA Polymerase	0,25
Eau nuclease-free	14.75
Produit de PCR d'amplification	2.5
Volume final	25

Le programme de PCR est reporté dans le Tableau 18, il a été réalisé sur un thermocycleur SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis).

Tableau 18 : Programme d'amplification de la 2^{ème} PCR de séquençage de *CXCR4*

	Température	Durée
Dénaturation initiale	98°C	30 secondes
Amplification : 12 cycles	98°C	10 secondes
	62°C	30 secondes
	72°C	30 secondes
Elongation finale	72°C	5 minutes
Stockage final	10°C	Infini

La purification post-PCR a été effectuée de la même façon que lors de la PCR d'amplification (III.5.4.1.1).

III.5.4.2. Validation des librairies

La pureté et la taille des amplicons générés ont été vérifiées par migration électrophorétique sur l'automate MultiNaTM (Shimadzu, Kyoto, Japon) avec le kit DNA-500 Kit[®] (Shimadzu, Kyoto, Japon) selon les instructions du fournisseur. La taille attendue des amplicons était de 284 pb pour la cible 1 et 304 pb pour la cible 2. La validation de la librairie était également attestée par l'absence d'amplicons dans le témoin d'eau.

Le dosage des librairies a été réalisé avec le fluoromètre InvitrogenTM QubitTM 2.0 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) et le kit QubitTM dsDNA BR Assay (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). La concentration de chaque librairie devait être supérieure ou égale à la concentration souhaitée du pool de librairies, soit 4 nmol/L. La conversion des concentrations massiques en concentrations molaires a été effectuée à l'aide du calcul ci-dessous :

$$\text{Concentration molaire (nmol/L)} = \frac{\text{Concentration massique de la librairie (ng/}\mu\text{L)}}{\text{Nombre de pb de l'amplicon} \times \text{Masse molaire d'une pb (660 g/mol)}} \times 10^6$$

Figure 30 : Calcul de conversion des concentrations massiques en concentrations molaires

III.5.4.3. Préparation du pool de librairies

Afin d'obtenir la librairie de séquençage, un mélange équimolaire à 4 nmol/L de toutes les librairies a été effectué. Ce mélange, ou pool a été conservé à -20°C avant utilisation.

III.5.4.4. Séquençage haut débit

Le principe du séquençage de nouvelle génération ainsi que de la technologie Illumina® sont rappelés en Annexe 6.

III.5.4.4.1. Préparation des réactifs Illumina®

L'ensemble des réactifs et la flow cell nécessaire au séquençage sont disponibles dans le kit MiSeq Reagent Kits v2 (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis). Les recommandations fournisseurs ont été respectées quant à la préparation des séquences à partir du pool et du chargement des réactifs sur le séquenceur.

III.5.4.4.2. Séquençage sur MiSeq Illumina®

Le séquençage haut débit de la zone d'intérêt du gène *CXCR4* a été effectué sur le séquenceur MiSeq (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis) (Figure 31).



Figure 31 : Séquenceur MiSeq Illumina® (115)

Les données de séquençage ont été importées sur le MiSeq via le logiciel Experiment Manager (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis) qui permet l'enregistrement des configurations du run et des informations concernant les échantillons.

Les configurations du run étaient les suivantes :

- Séquençage *paired-end* : cela signifie que la lecture des séquences a lieu dans les deux sens ($3' \rightarrow 5'$ puis $5' \rightarrow 3'$)

- 500 cycles : ou 2x250 cycles, cela signifie que 250 bases sont lues dans un sens puis 250 bases dans l'autre sens. Ici, les deux amplicons étudiés faisaient 284 et 304 pb, il y a donc eu un recouvrement des deux séquences, augmentant ainsi la qualité de lecture des bases.

La flow cell nano v2 utilisée en *paired-end* permet théoriquement de générer 2 millions de « reads » (séquences lues) ce qui correspond à 500Mb de données informatiques.

La réaction de séquençage a duré 19 heures. Les données ont été récupérées au format FASTQ sur le séquenceur.

III.5.4.4.3. Analyse bio-informatique des données de séquençage

Le séquençage de la partie C-terminale de *CXCR4* a été réalisé en *paired-end*, ainsi chaque séquence a été lue dans les deux sens sur 250 pb. Nos cibles étant de 284 et 304 pb, les deux *reads* obtenus se recouvraient sur 200 pb environ. Une fusion (*merging*) de chaque paire de *reads* ainsi constituée a été réalisée à l'aide du logiciel d'analyse de séquence Usearch (116). Cette première étape avait pour but d'éliminer les erreurs de lecture liées au séquençage en réattribuant un score de qualité à chaque base, selon sa concordance avec son homologue sur le second *read*. Les règles suivantes ont été appliquées lors du *merging* :

- Si présence de plus de 10 discordances entre les deux *reads*, ils sont rejetés
- Si deux bases homologues sont identiques, le score qualité associé à la base est augmenté dans le *read* fusionné
- Si deux bases homologues sont différentes, la base associée au score de qualité le plus haut est conservée, cependant il sera abaissé dans le *read* fusionné
- Si deux bases homologues sont différentes et que les scores qualités associés sont identiques, la base est remplacée par un « N » dans le *read* fusionné

Les *reads* « mergés » au format FASTQ ont ensuite été alignés sur le génome humain GRCh37 (hg19) avec l'algorithme bwa mem du logiciel bwa (*Burrows-Wheeler Alignment*) (117). Un appel de variants a ensuite été réalisé sur le fichier BAM aligné, les SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), les insertions et les délétions ont été relevées. Les deux *variant caller* utilisés étaient : samtools mpileup et VarScan2 (118). Les VAF (*Variant Allele Frequency*) < 0.001 n'ont pas été retenues (Figure 32).

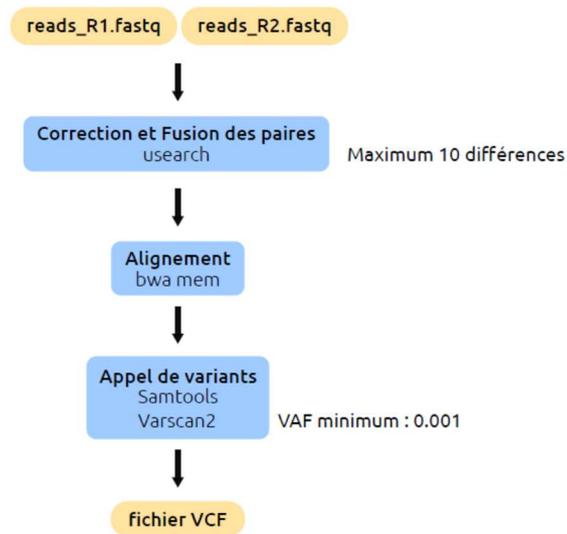


Figure 32 : Pipeline utilisé pour l'appel de variants

L'annotation des variants a été effectuée à l'aide d'un outil informatique qui interroge la base de données Ensembl VEP (*Variant Effect Predictor*) (119) au moyen d'un web service : API REST (*Application Programming Interface Representational State Transfer*) (120). Cet outil permet la lecture et la validation biologique des variants.

La validation des variants annotés a nécessité une revue manuelle de chacun d'eux à l'aide du logiciel IgV® (*Integrative Genomics Viewer*) et les règles suivantes ont été appliquées :

- Profondeur minimale de 100 *reads* à la position mutée
- Nombre de *reads* mutés ≥ 10
- Fréquence allélique minimale de 1% (VAF)

IV. Résultats

IV.1. Caractéristiques patients

La cohorte était finalement composée de 84 patients, parmi lesquels on comptait 30 femmes et 54 hommes. L'âge médian était de 71,5 ans avec un intervalle de 47 à 95 ans. La médiane du taux d'IgM chez les 79 patients concernés était de 6.4 g/L avec un intervalle de 1 à 45,4 g/L.

Parmi les 84 patients, 9 ont bénéficiés d'un caryotype au diagnostic dont 4 étaient anormaux chez des patients atteints de MW (diagnostic initial) :

- t(3;6)(q13;q14) (n=1)
- der(11)t(3;11)(q13;q21) (n=1)
- monosomie Y (n=1)
- caryotype complexe (n=1)

IV.2. Relecture cytologique

L'objectif primordial de la relecture cytologique était d'obtenir pour chaque patient, une valeur la plus juste possible du pourcentage de lymphocytes dans la moelle. Ce résultat a contribué à la réalisation de la reclassification diagnostique sans ambiguïté.

Lors de la relecture, il a été observé une infiltration plasmocytaire médullaire identique, de 2 à 3% en moyenne, dans chacun des trois groupes diagnostiques (MW, M-MGUS et autres lymphomes). En revanche, 22/26 (85%) des échantillons du groupe MW présentaient des lymphoplasmocytes (résultat semi-quantitatif, voir Annexe 1), contre 25/50 (50%) des échantillons du groupe M-MGUS. Les cytologies médullaires des autres lymphomes ne rapportaient pas la présence de lymphoplasmocytes. De plus, la présence de mastocytes a été remarquée dans 13/26 (50%) des échantillons du groupe MW et 12/50 (24%) de ceux du groupe M-MGUS, ils étaient absents dans les cas d'autres lymphomes. Ces résultats sont présentés à la Figure 33, des images de microscopie médullaire également (Figure 34 et Figure 35).

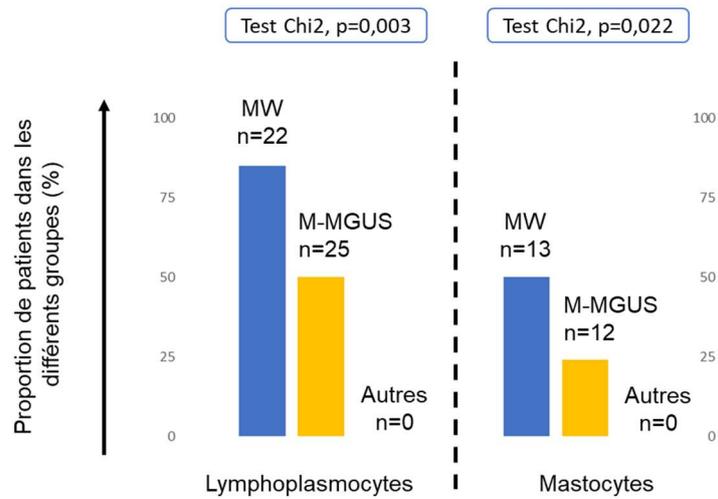


Figure 33 : Proportion de patients dans chaque groupe diagnostique présentant des lymphoplasmocytes ou des mastocytes dans la moelle au diagnostic

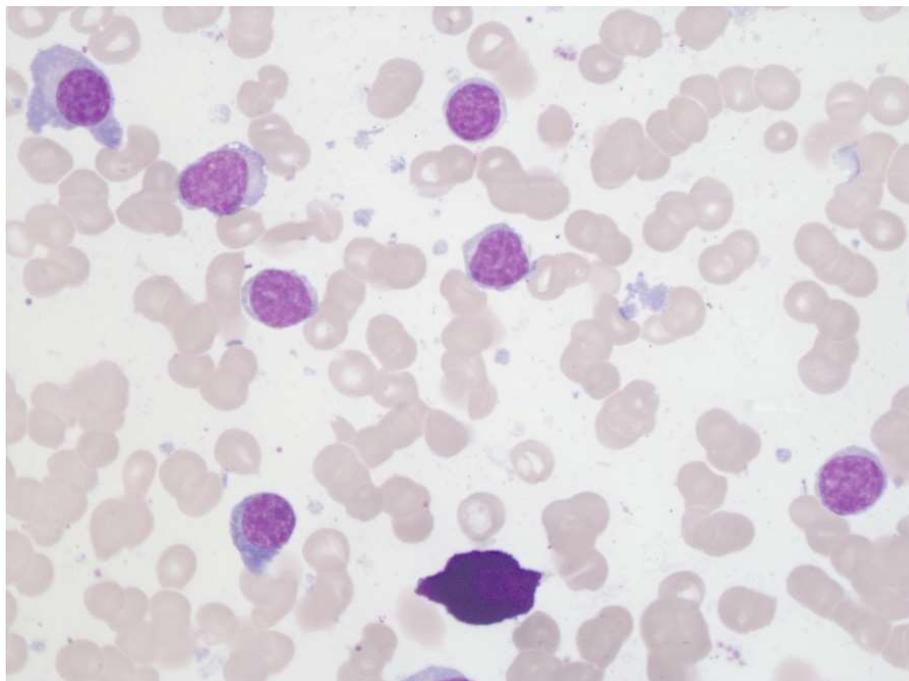


Figure 34 : Moelle osseuse d'un patient MW au x1000, on observe un plasmocyte (en haut à gauche), un *continuum* lymphoplasmocytaire et un mastocyte (en bas sur l'image)

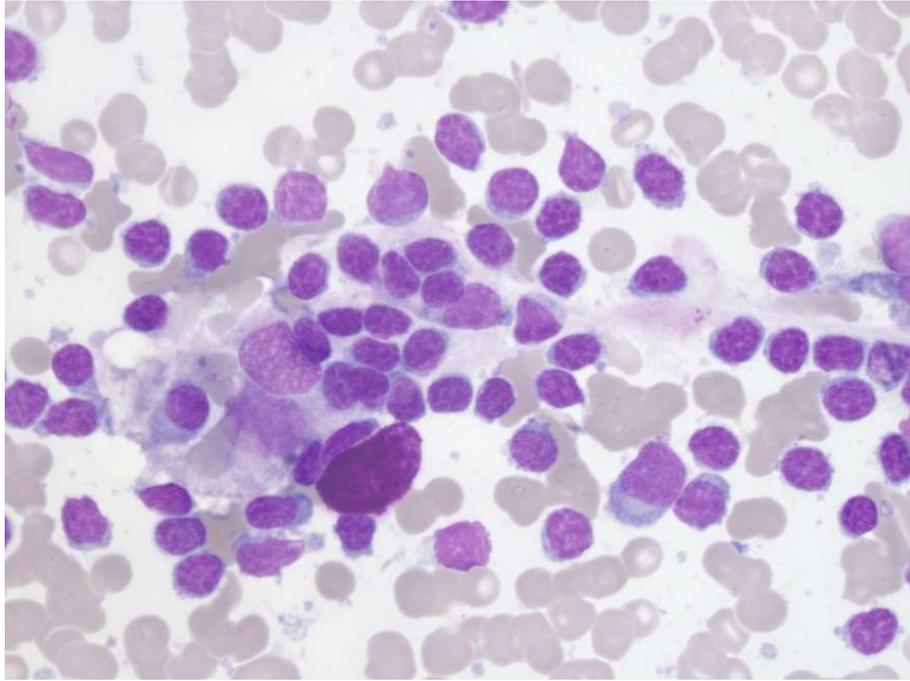


Figure 35 : Moelle osseuse d'un patient MW au x1000, on observe un *continuum* de différenciation lymphoplasmocytaire et un mastocyte

IV.3. Quantification du clone en cytométrie et reclassification diagnostique

Les résultats des immunophénotypages ont été retraités de façon uniforme pour l'ensemble des patients. La stratégie de fenêtrage est rapportée au paragraphe III.3.. Un exemple de fenêtrage lymphocytaire est présenté à la Figure 36.

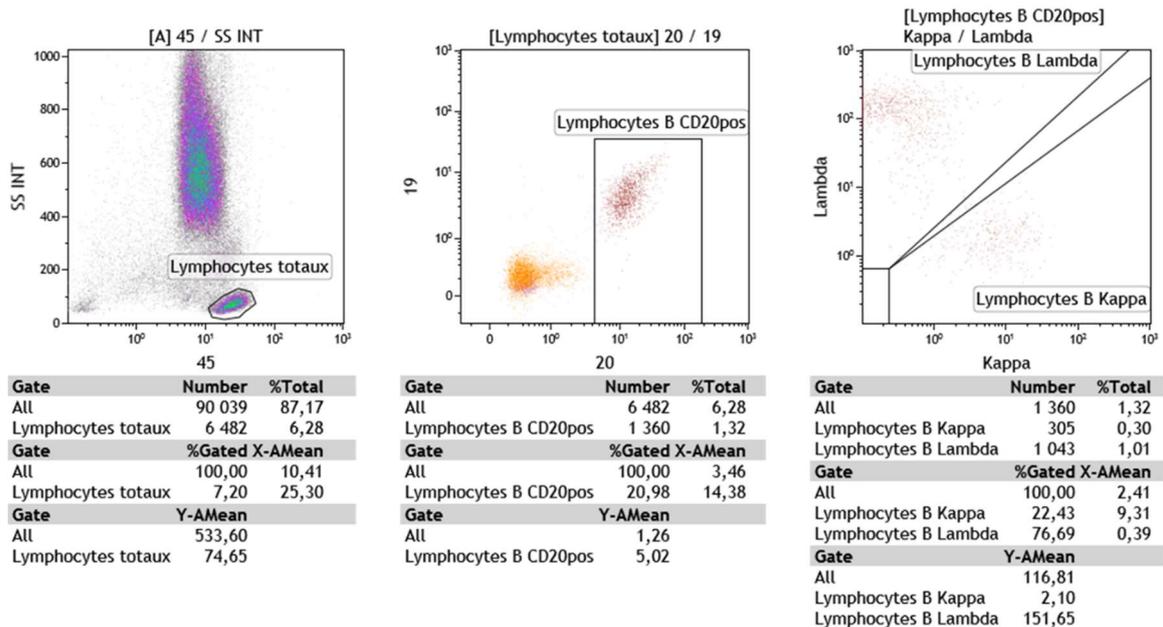


Figure 36 : Exemple de fenêtrage des lymphocytes totaux, des lymphocytes B et de leurs chaînes légères κ/λ

Ce travail a permis, dans un premier temps, de déterminer la proportion de lymphocytes clonaux présents au sein des lymphocytes totaux afin de réaliser la revue diagnostique. Le seuil de 10% d'infiltration médullaire par les lymphocytes tumoraux a été appliqué (81,82,114) et les données cliniques ont permis de compléter le diagnostic. Ainsi, au sein de la cohorte composée de 84 patients, 26 MW ont été diagnostiquées, parmi lesquelles 12 formes symptomatiques et 14 *smoldering*, 50 M-MGUS dont 9 avaient une symptomatologie liée à l'IgM et 3 lymphomes de bas grade non LLC (1 LZM et 2 LNH-B) (Figure 37). On retrouvait également les 5 patients ajoutés en cours de recrutement avec 1 LPL à IgA, 2 LPL à IgG et de 2 G-MGUS.

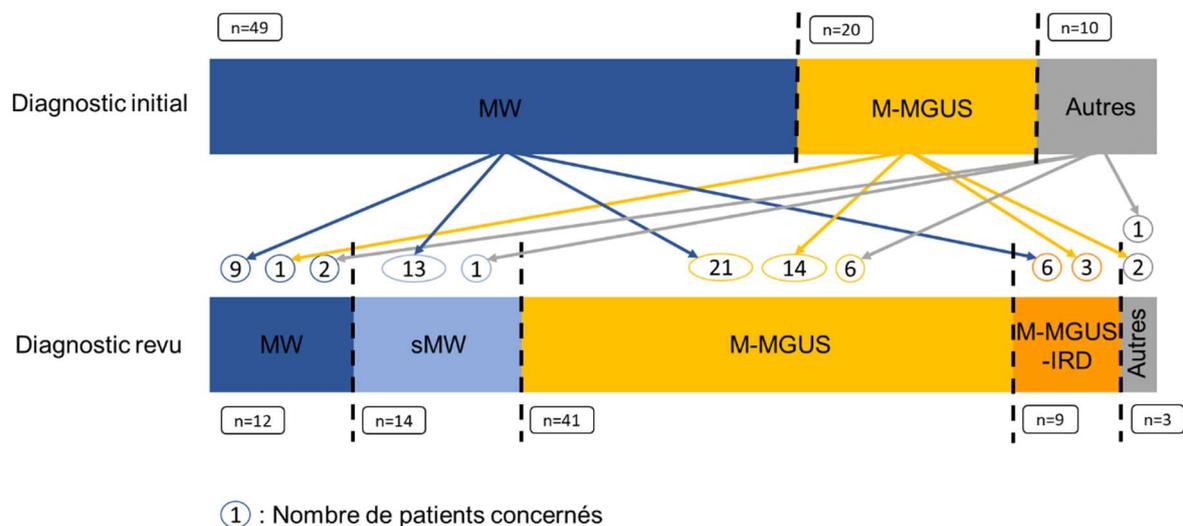


Figure 37 : Résultats de la revue diagnostique

IV.4. Analyse qualitative des immunophénotypes

IV.4.1. Caractérisation du phénotype lymphocytaire tumoral

Hormis un cas douteux, tous les échantillons de MW présentaient un clone lymphocytaire. Ce clone était également retrouvé dans 35/50 (70%) des M-MGUS. Les autres lymphomes (1 LZM et 2 LNH-B) ne présentaient pas de clone lymphocytaire en cytométrie. En outre, il n'a pas été retrouvé de double clone lymphocytaire dans cette cohorte.

Le clone lymphocytaire B détecté était CD19+ et CD20+, le CD5 était rarement positif (3/25 (12%) des cas de MW et 8/35 (23%) des M-MGUS). La chaîne légère associée était de type κ le plus souvent : 22/25 (88%) des cas de MW et 27/35 (77%) des M-MGUS (Figure 38).

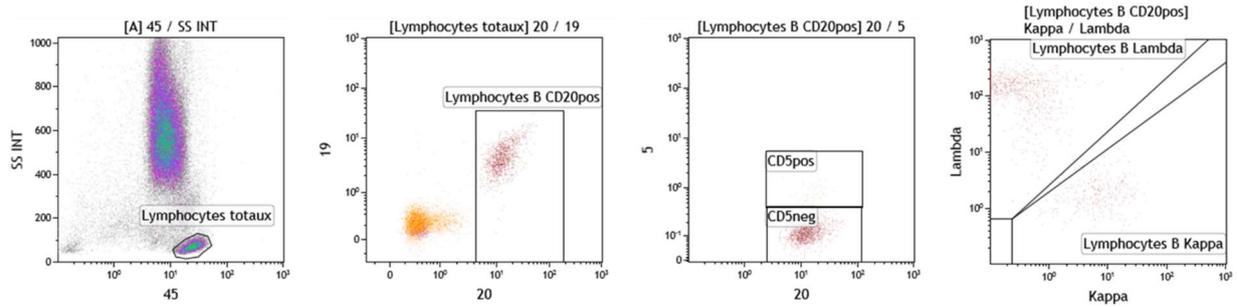


Figure 38 : Immunophénotypage lymphocytaire dans le cas d'un M-MGUS

L'expression du CD38 sur les lymphocytes B monotypiques a également été étudié. Elle était variable, autant dans les MW que dans les M-MGUS ($p=0.124$ au risque de 5%, test ANOVA (*analysis of variance*)) (Figure 39).

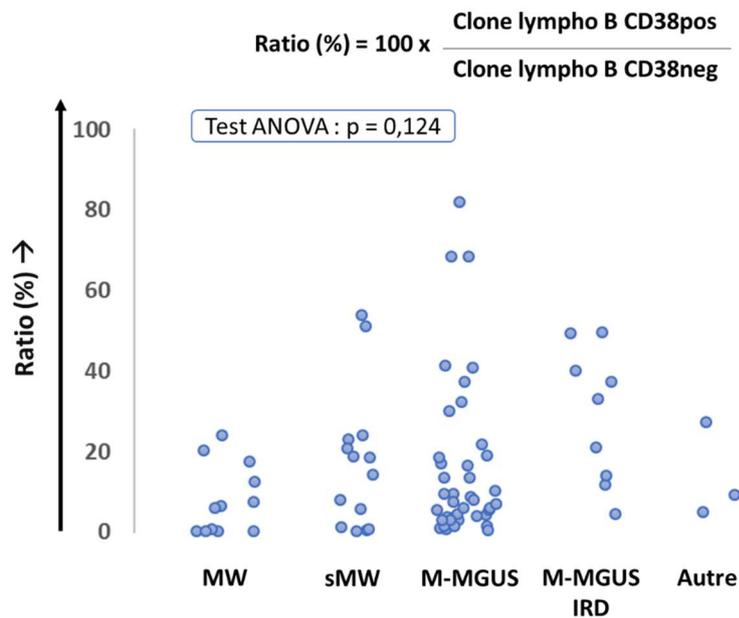


Figure 39 : Pourcentage de lymphocytes B totaux exprimant le CD38. Test statistique ANOVA (*analysis of variance*) au risque de 5%.

Les 3 LPL possédaient un clone lymphocytaire B ainsi que 1/2 (50%) G-MGUS. Les profils phénotypiques lymphocytaires étaient identiques : CD19+, CD20+ et CD5- (Figure 40 et Figure 41) et similaires à ceux des groupes MW et M-MGUS.

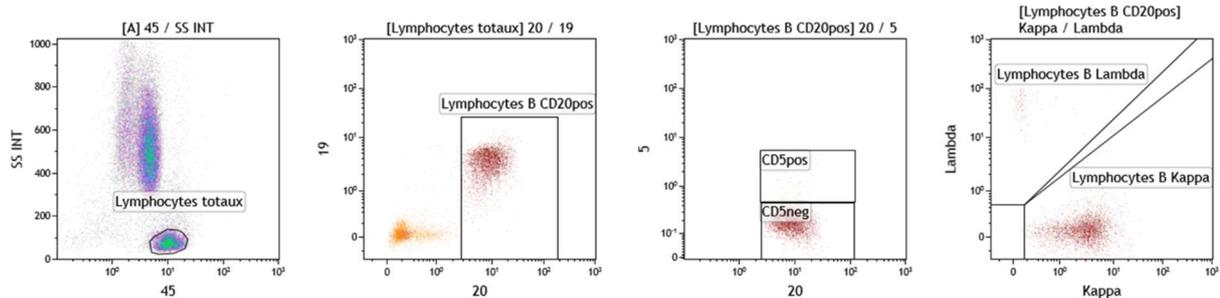


Figure 40 : Immunophénotypage lymphocytaire dans le cas d'un LPL à IgG

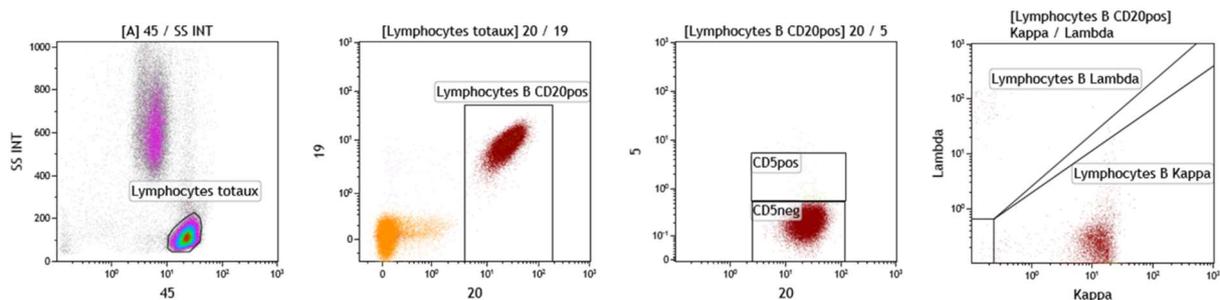


Figure 41 : Immunophénotypage lymphocytaire dans le cas d'un G-MGUS

Le tube 2 du panel lymphocytaire (Tableau 6) n'était pas réalisé en l'absence de clone B soit dans 20/84 (24%) des cas. Cependant, 18/84 (21%) échantillons présentant un clone B n'en ont pas bénéficié (prélèvement insuffisant, nécessité appréciée au cas par cas...). Toutefois, lorsque celui-ci était réalisé, soit pour 46/84 (55%) patients, le score de Matutes (Tableau 2) obtenu était compris entre 0 et 3 pour tous les groupes.

IV.4.2. Caractérisation du phénotype plasmocytaire tumoral

Un clone plasmocytaire était mis en évidence dans 16/26 (62%) des MW et presque toujours associé à une population lymphocytaire B clonale (1 seul cas de monotypie lymphocytaire douteuse), 20/50 (40%) des M-MGUS et 1/3 (33%) des autres lymphomes (cas correspondant au LZM).

Le marquage CD19/CD56 a échoué pour l'un des 37 échantillons présentant un clone plasmocytaire, les résultats portent sur les 36 patients restant. L'immunophénotypage des plasmocytes monotypiques montrait un profil majoritairement CD19+/CD56- (26/36, soit 72%) (Figure 42).

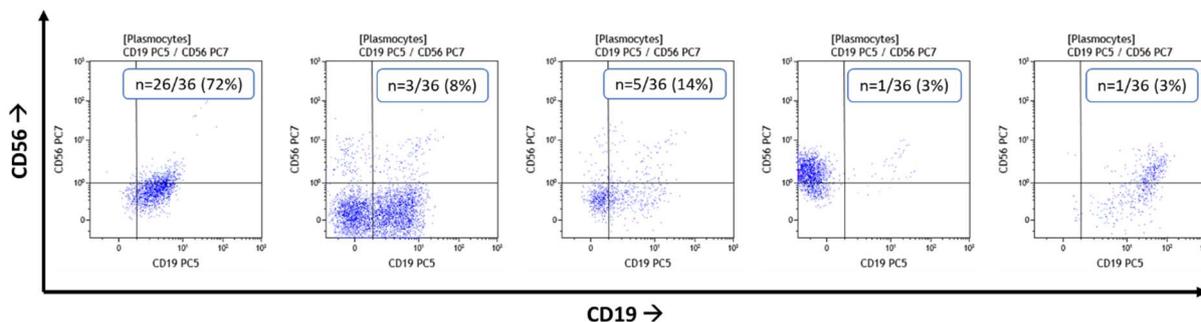


Figure 42 : Expression du CD19 et du CD56 sur les plasmocytes monotypiques de la série de patients (MW, M-MGUS et autres lymphomes)

Le marquage par le CD20 n'a pas été effectué pour 9 échantillons parmi les 37 concernés (marqueur CD20 inséré dans le tube 2 en 2014), toutefois, le profil était CD20- le plus souvent (23/28, soit 82%) (Figure 43).

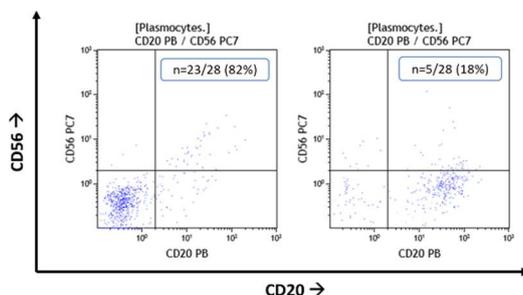


Figure 43 : Expression du CD20 sur les plasmocytes monotypiques de la série de patients (MW, M-MGUS et autres lymphomes)

La chaîne légère exprimée par le clone plasmocytaire était systématiquement la même que celle exprimée par le clone lymphocytaire correspondant (majoritairement κ).

Différents phénotypes plasmocytaires ont été comparés au phénotype majoritaire de la série de patient, ils sont représentés à la Figure 44.

- Le phénotype des plasmocytes normaux est caractérisé par l'expression du CD19 de façon majoritaire, alors que le CD20 et le CD56 sont négatifs (73). Une moelle réactionnelle identifiée en cytologie médullaire au cours de l'étude a été phénotypée (panel lymphocytaire et plasmocytaire), elle permet une visualisation plus aisée d'un phénotype normal (car le nombre de plasmocytes est plus important).
- Le phénotype plasmocytaire tumoral de la cohorte de 30 patients atteints de myélome était CD19- et CD20-. Parmi eux, 19/30 (63%) exprimaient le CD56.
- Parmi les 3 LPL de la cohorte, 2/3 (67%) présentaient un clone plasmocytaire (1 LPL à IgG et 1 à IgA) et 1/2 (50%) exprimait le CD19 (LPL à IgA). Le CD20 et le CD56 étaient négatifs.

- Un seul des deux G-MGUS possédait un petit clone plasmocytaire, ce dernier était CD19-, CD20- et CD56-.

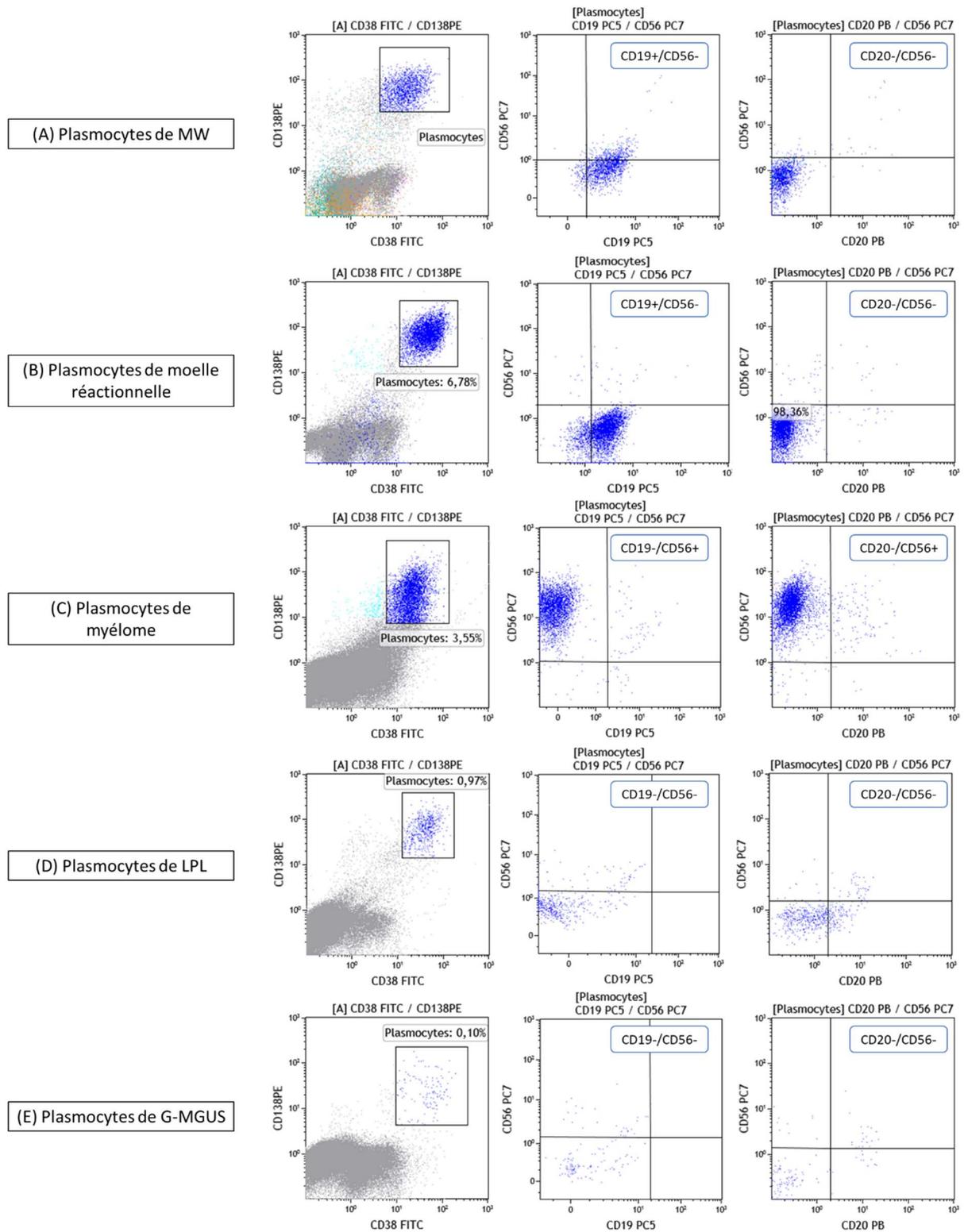


Figure 44 : Expression du CD19, du CD20 et du CD56 sur les plasmocytes (A) de MW, (B) de moelle réactionnelle, (C) de myélome, (D) de LPL et (E) de G-MGUS

Au sein de la série de 79 patients présentant un pic IgM, la présence d'un clone plasmocytaire était fortement associée à un taux d'IgM monoclonale > 3 g/L ($p=8.72 \times 10^{-5}$ au risque de 5%, test Chi2) (Figure 45).

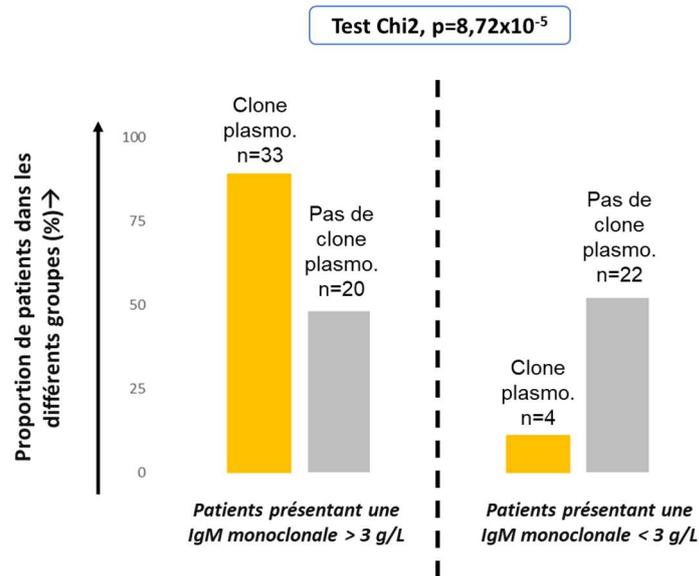


Figure 45 : Fréquence de la monotypie plasmocytaire selon le taux d'IgM monoclonale

IV.4.3. Analyse quantitative des populations tumorales

La MW et ses phases précoces se caractérisent par la présence d'un *continuum* de différenciation lymphoplasmocytaire médullaire. C'est le degré d'infiltration de la moelle par ce clone qui permet la distinction des différents groupes diagnostics. Toutefois, nous nous sommes demandé si le degré de différenciation des lymphoplasmocytes clonaux pouvait être différent entre ces différents groupes et de la même façon si la proportion du clone au sein de la population polytypique résiduelle pouvait également constituer un élément diagnostique discriminant. Nous avons donc testé ces hypothèses à l'aide des données de CMF obtenues (Figure 46, Figure 47 et Figure 48).

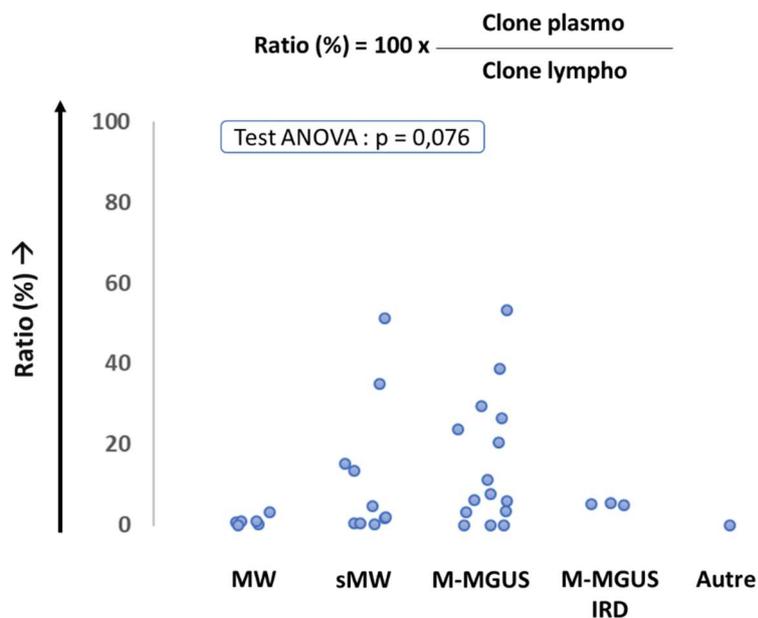


Figure 46 : Ratio entre les populations monotypiques plasmocytaires et lymphocytaires, exprimé en pourcentage. Test statistique ANOVA au risque de 5%.

Le rapport des populations monotypiques plasmocytaires sur la population monotypique lymphocytaire correspondant ne permettait pas de distinguer les MW des M-MGUS et autres lymphomes ($p=0.076$ au risque de 5%, test ANOVA).

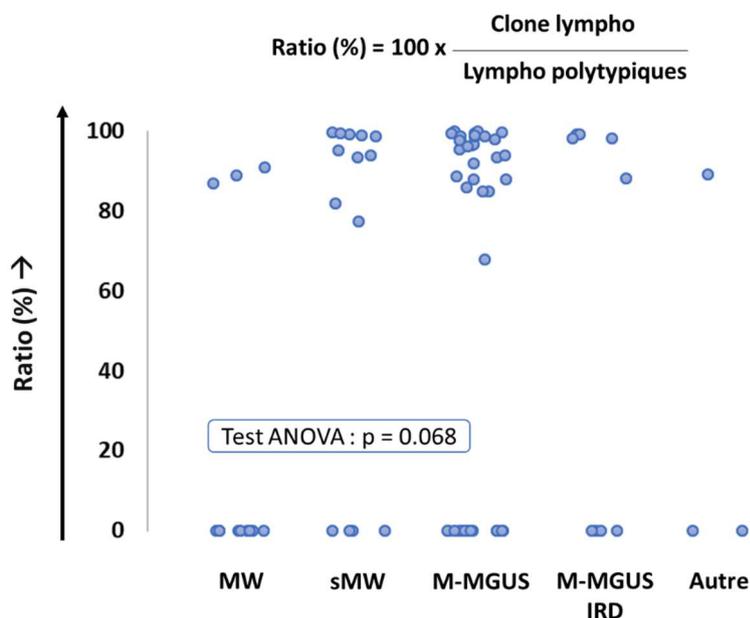


Figure 47 : Ratio entre les populations lymphocytaires monotypiques et polytypiques exprimé en pourcentage. Test statistique ANOVA au risque de 5%.

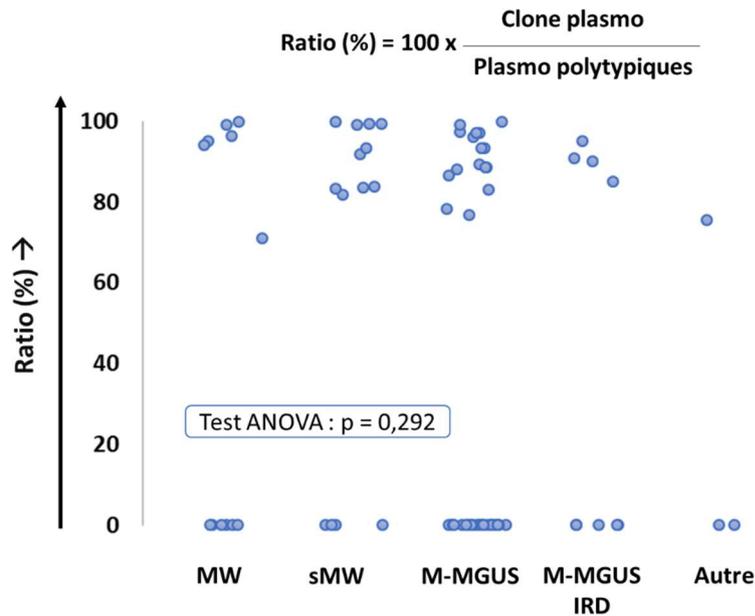


Figure 48 : Ratio entre les populations plasmocytaires monotypiques et polytypiques exprimé en pourcentage. Test statistique ANOVA au risque de 5%.

De même, le rapport de la population monotypique lymphocytaire ou plasmocytaire sur la population polytypique résiduelle correspondante ne permettait pas de distinguer les MW des M-MGUS et autres lymphomes ($p=0.068$ et $p=0.292$ respectivement, au risque de 5%, test ANOVA).

IV.5. Statut *MYD88* et classification diagnostique

Le dépistage de la mutation la plus fréquemment retrouvée de *MYD88* dans la MW : L265P, a été réalisé par PCR spécifique d'allèle. Parmi les 57 patients mutés *MYD88* de la cohorte, 55/57 (96%) portaient la mutation L265P détectée en PCR-AS (Figure 49). Les sujets négatifs ou faiblement positifs (Figure 50) au dépistage ont bénéficié d'un séquençage du domaine TIR du gène *MYD88* par méthode Sanger.

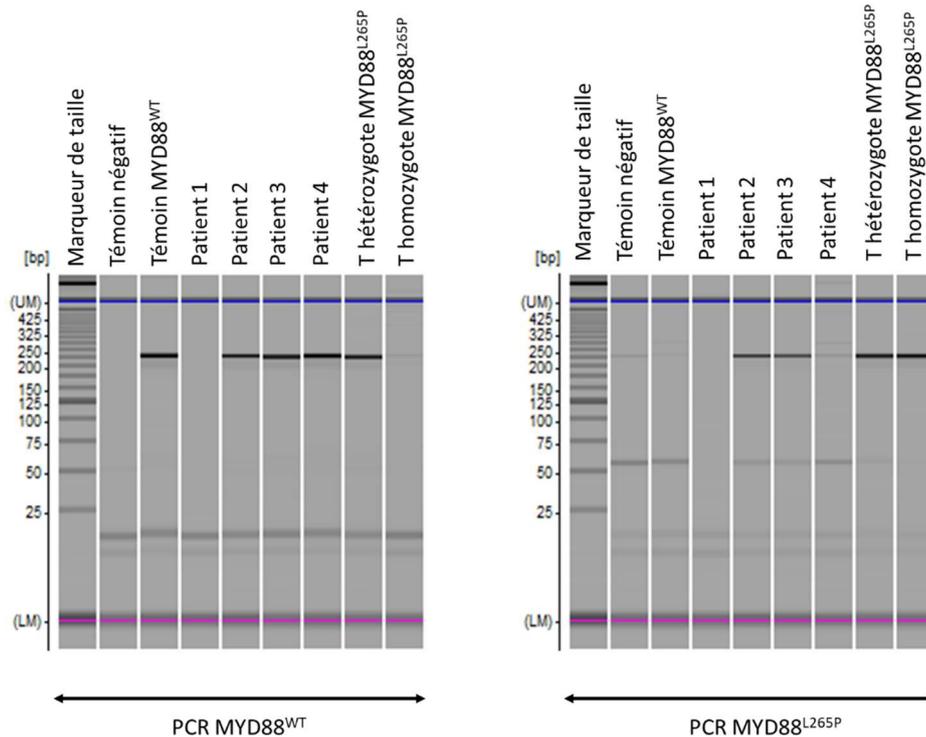


Figure 49 : Résultats de PCR-AS *MYD88* L265P (migration électrophorétique au MultiNa™) pour 4 patients de la cohorte (T signifie témoin)

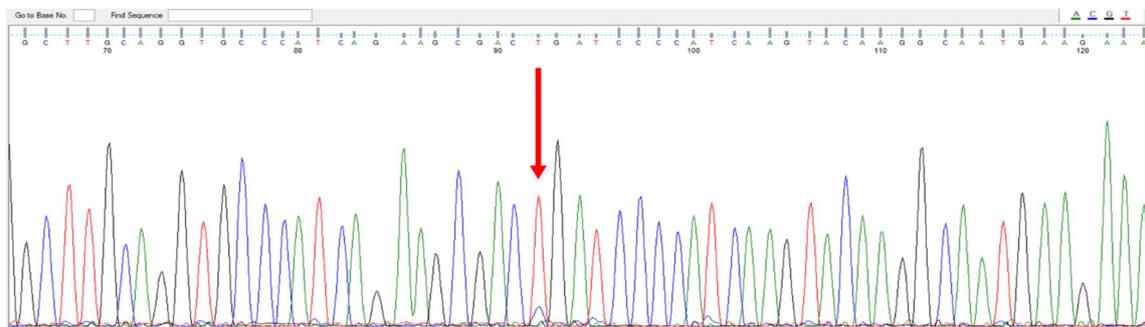


Figure 50 : Mutation c.794T>C, p.L265P de *MYD88* identifiée par séquençage Sanger et faiblement positive en PCR spécifique d'allèle

Le séquençage par méthode Sanger a permis d'identifier dans le domaine TIR de *MYD88* :

- 1 mutation *V217F* chez un sujet atteint de MW (Figure 51) : c.649G>T, p.Val217Phe
- 2 mutations *S219C* pour un cas de LPL à IgG (Figure 52)
 - 1 mutation modifiant le cadre de lecture c.656C>G, p.Ser219Cys
 - 1 mutation silencieuse c.657T>C, p.Ser219Cys

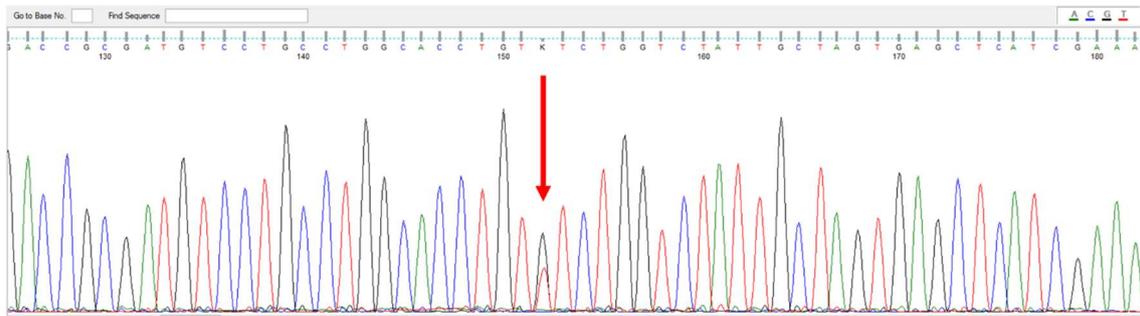


Figure 51 : Mutation c.649G>T, p.V217F de *MYD88* identifiée par séquençage Sanger

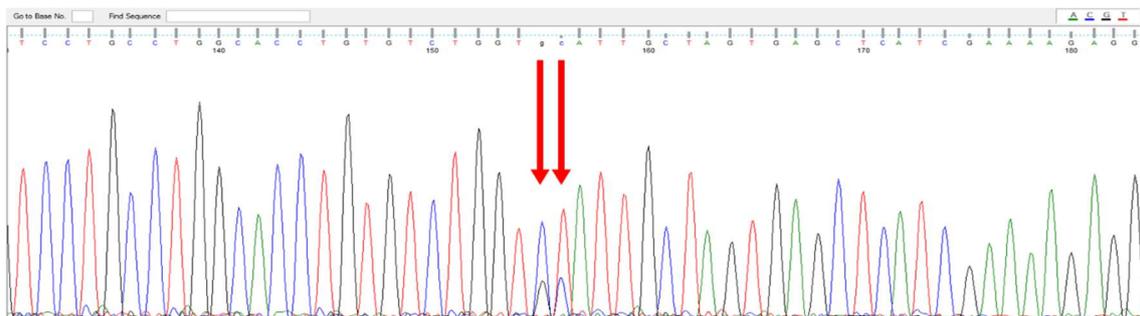


Figure 52 : Mutations c.656C>G, p.S219C et c.657T>C, p.S219C de *MYD88* identifiées par séquençage Sanger

In fine, une mutation de *MYD88* était retrouvée dans 24/26 (92%) des MW, 31/50 (62%) des M-MGUS mais dans aucun des cas d'autres lymphomes. Parmi les cas de LPL non-IgM, 2/3 (67%) présentaient une mutation de *MYD88*.

IV.6. Exploration des mutations de *CXCR4*

IV.6.1. Evaluation de la PCR spécifique d'allèle pour dépister la mutation *CXCR4* S338X

La PCR spécifique d'allèle de *CXCR4* permet d'identifier simultanément les mutations S338X c.C1013G et c.C1013A (48) qui sont les mutations les plus fréquemment retrouvées dans la MW (36). Cette technique a été utilisée dans l'étude à titre de dépistage, les résultats négatifs devant être explorés par séquençage NGS. Elle a été testée sur 13 patients de la cohorte, la méthode de réalisation est la même que celle de PCR-AS *MYD88* L265P. Parmi les 13 patients testés, 2/13 (15%) présentaient la mutation S338X. Le résultat de l'un d'eux est représenté sur la Figure 53 et correspond au patient n°1, la mutation S338X a été confirmée par séquençage Sanger (Figure 54).

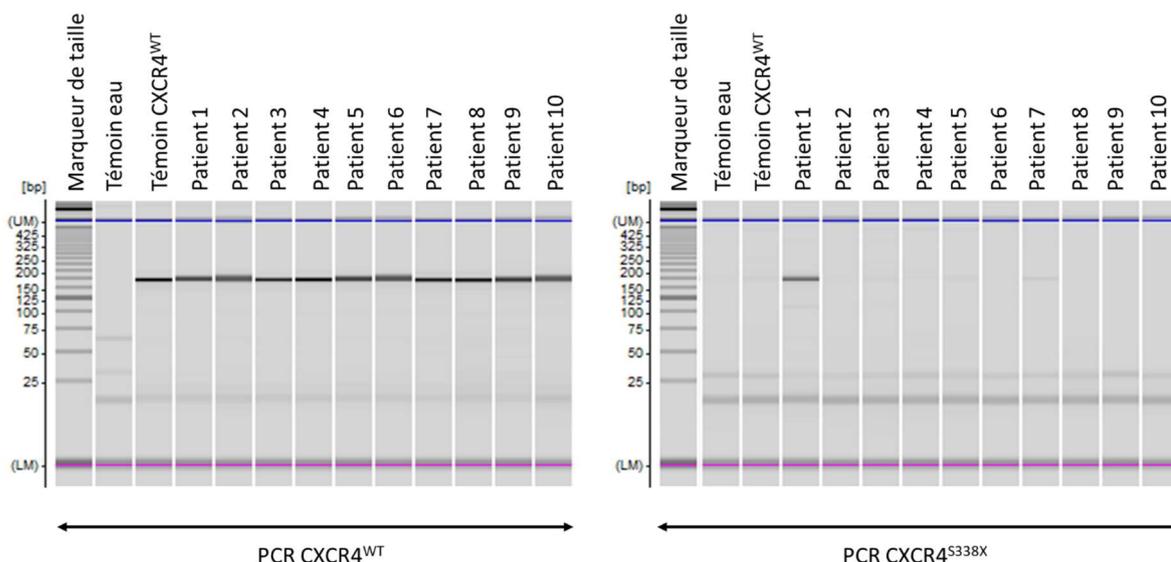


Figure 53 : Résultats de PCR-AS *CXCR4* S338X (migration électrophorétique au MultiNa™) pour 10 patients de la cohorte

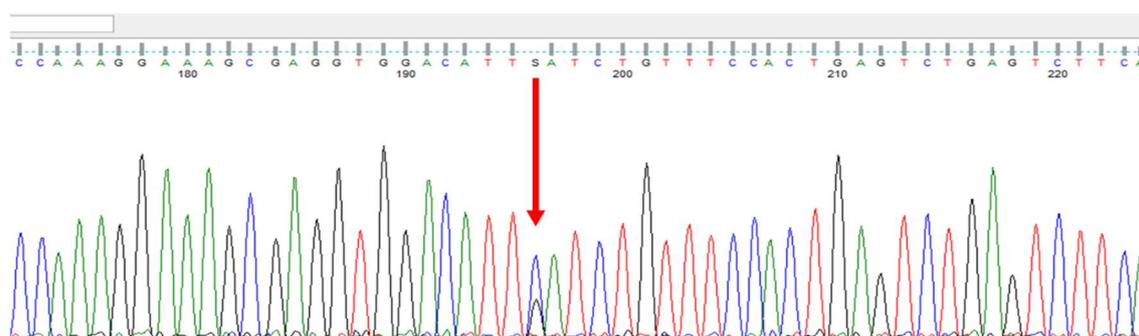


Figure 54 : Mutation c.C1013G, p.S338X de *CXCR4* retrouvée chez le patient 1 et vérifiée par séquençage Sanger

Cependant, le second patient dépisté par cette méthode était faiblement positif et la mutation n'était pas confirmée par séquençage Sanger. L'interprétation de ce résultat, de surcroît en l'absence de témoin positif, était délicate. De plus, le dépistage de la mutation S338X n'a d'intérêt que si la spécificité de la technique est grande. A la vue de ces résultats, la technique a été abandonnée au profit du séquençage haut débit pour tous les échantillons.

IV.6.2. Mutations de *CXCR4* identifiées par séquençage haut débit

La température de fusion optimale des amorces, ou T_m , a été déterminée lors du premier run test de PCR d'amplification. Les T_m des quatre amorces (sens et antisens des deux cibles) calculés par le T_m Calculator de ThermoFischer® étaient comprises entre 63° et 65°C. Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 55. Ceux-ci étant très semblables, la température de 63°C a été retenue arbitrairement.

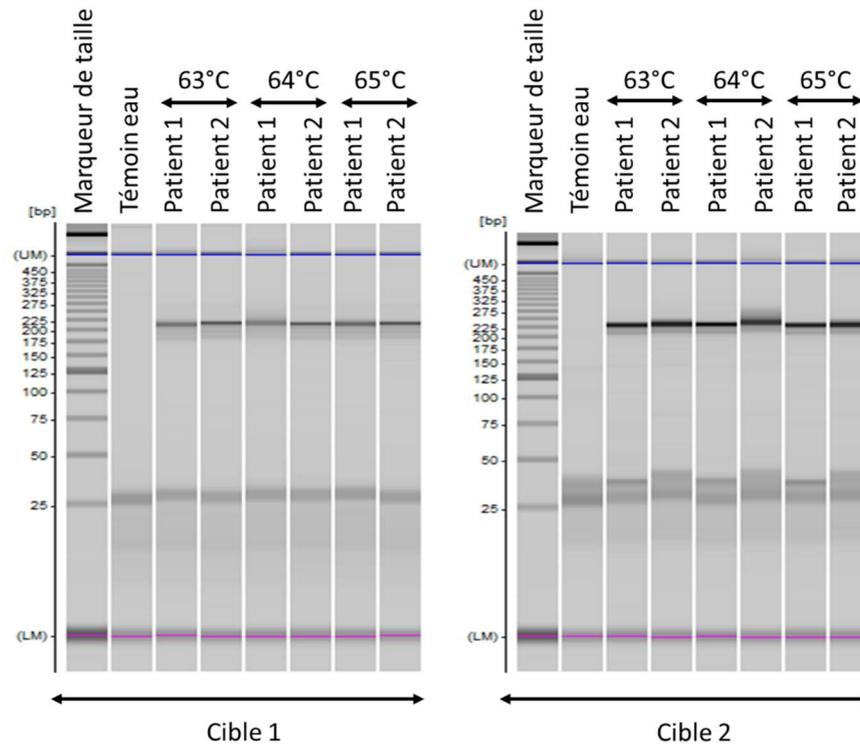


Figure 55 : Test de la température d'élongation du programme de la PCR d'amplification : Tm de 63°C, 64°C et 65°C sur 2 patients de la série (migration électrophorétique au MultiNa™).

La librairie a été constituée pour les 84 patients en 12 séries de manipulations. Chaque série comprenait un témoin négatif (eau), unique, qui suivait toutes les étapes de préparation. Chaque librairie a bénéficié d'un contrôle qualitatif par migration électrophorétique afin de s'assurer de sa pureté et de la taille de l'amplicon (284 pb pour la cible 1 et 304 pb pour la cible 2) (Figure 56). De même, un contrôle quantitatif a été réalisé par dosage ADN haute sensibilité au Qubit™ (concentration minimale requise : 4 nmol/L).

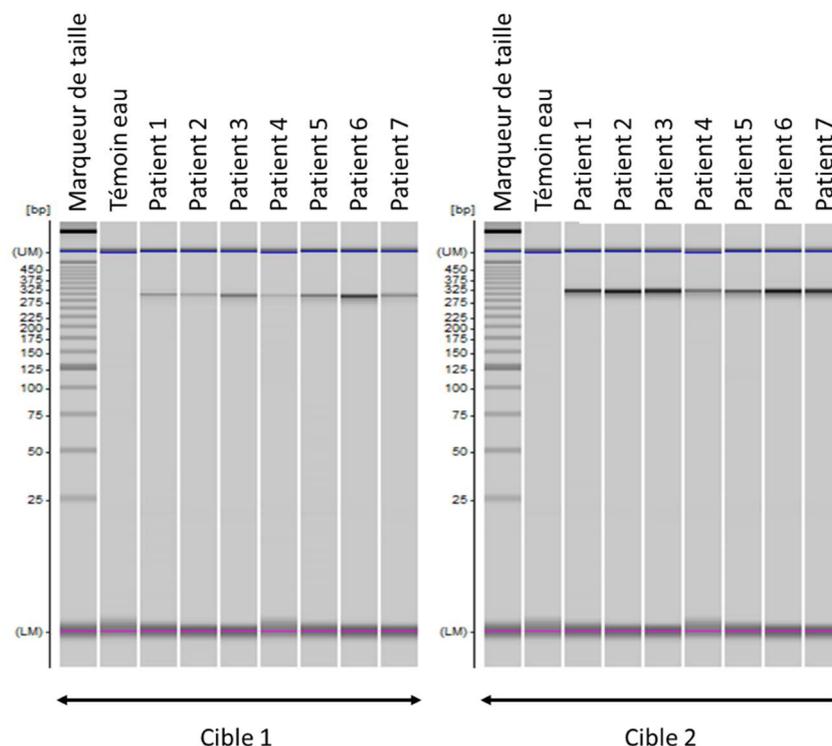


Figure 56 : Validation des bibliothèques de séquençage pour 7 patients de la série (migration électrophorétique au MultiNa™)

Chaque échantillon a entraîné la réalisation de deux bibliothèques (cibles 1 et 2). De plus, deux témoins négatifs ont été passés en duplicat. Les 172 bibliothèques ainsi générées ont été mélangées et séquencées en un seul passage sur le MiSeq Illumina®.

La qualité des fichiers FASTQ récupérés à la fin du séquençage a été contrôlée avec le logiciel FastQC® via l'interface Galaxy (<https://usegalaxy.org>) (Figure 57). Le score de qualité phred était supérieur à Q30 (probabilité d'erreur : 1 pour 1000, précision de l'identification d'une base : 99.9%) sur l'ensemble des cycles de chaque séquence hormis lors d'un cycle correspondant exactement à l'avant-dernier nucléotide des amorces. Cette anomalie inexplicable était présente pour toutes les séquences du run sans impact sur la qualité du reste des séquences. Les séquences constituant la bibliothèque mesuraient environ 300 pb, la puce utilisée lors du séquençage permettait la lecture de 2 x 250 pb et recouvrait donc largement la zone d'intérêt. Cela explique la mauvaise qualité de lecture observée à partir du 175ème cycle qui correspond à la fin de la séquence.

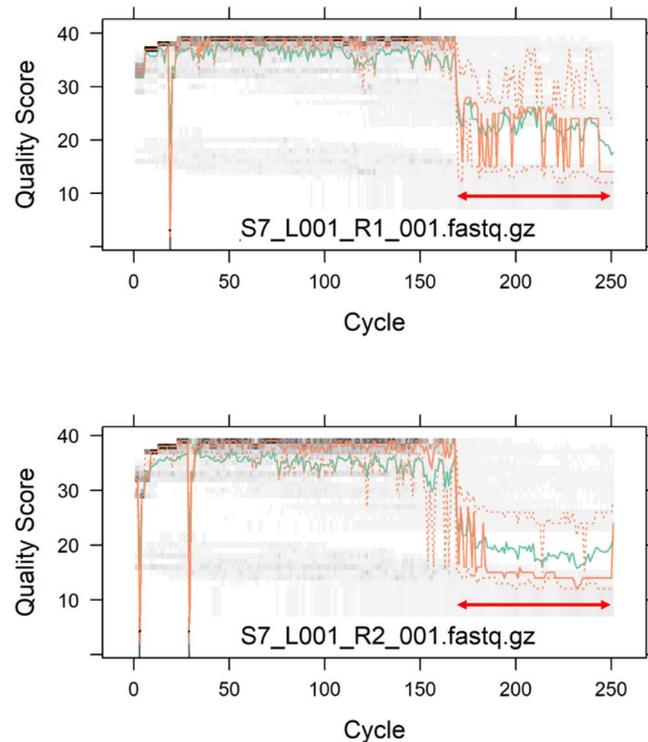


Figure 57 : Représentation graphique du score qualité attribué à chaque cycle du séquençage (le séquençage en *paired-end* implique deux lectures de chaque séquence : R1 et R2)

Environ 85% des *reads* complémentaires ont pu être fusionnés (*merging*) pour chaque échantillon. Les 15% écartés de l'analyse présentaient plus de 10 différences par paire. Ces résultats ont été alignés sur le génome humain et un appel de variant et ainsi que leur annotation ont été réalisés (voir paragraphe III.5.4.4.3). Au total, 20 variants ont été relevés chez 17 patients et la validation de ces derniers a été effectuée par concertation biologique en suivant les règles précitées (III.5.4.4.3). *In fine*, 12 variants ont été validés chez 11/84 (13%) sujets de la cohorte.

Une mutation de *CXCR4* a été retrouvée dans 6/26 (23%) des cas de MW, 4/50 (8%) des M-MGUS et dans un cas de LPL à IgG. Ces mutations étaient de type *frameshift* majoritairement (8/12 (67%)) et de type *stop gained* (4/12 (33%)). La mutation la plus fréquente de *CXCR4*, S338X (c.1013C>G), a été détectée dans 4/12 (33%) des cas, soit 2/26 (8%) des MW, 1/9 (11%) des M-MGUS-IRD et 1/2 (50%) des LPL à IgG. (47–49). Les mutations *frameshift* T318Nfs*, V320Efs* et S341Pfs* avaient préalablement été rapportées par *Treon et al.* en 2014 (77). La liste exhaustive des mutations retrouvées à l'issue du séquençage ainsi qu'une représentation schématique de la protéine *CXCR4* et des différents *hotspots* sont présentées à la Figure 58.

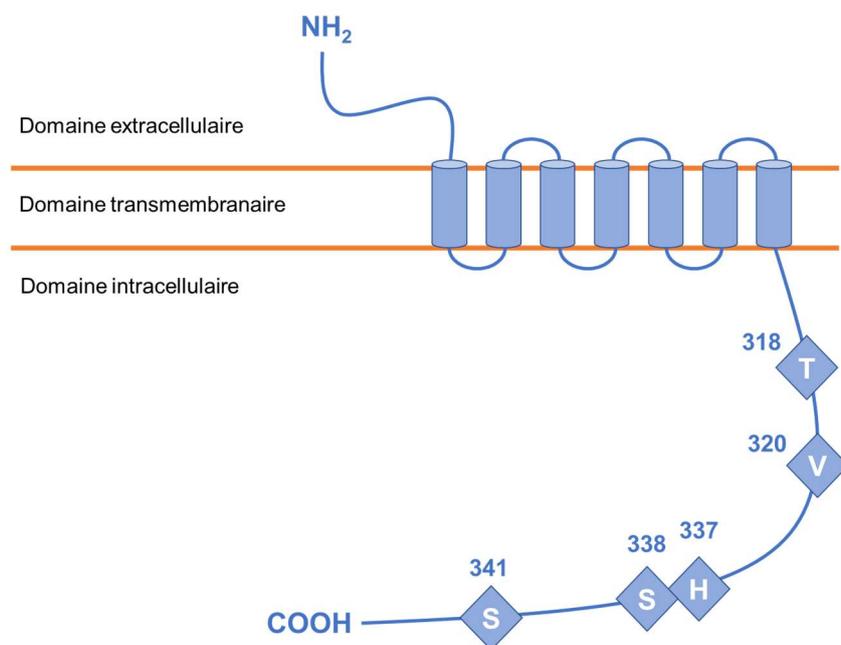


Figure 58 : Représentation schématique des différentes mutations somatiques retrouvées par séquençage haut débit dans le domaine C-terminal de *CXCR4* parmi les échantillons de la cohorte

Les fréquences alléliques des variants étaient comprises entre 1 et 16 % avec une médiane de 3.5%. L'infiltration médullaire par le clone B variait de 4 à 42% avec une médiane de 27%. L'ensemble de ces résultats, ainsi que la présence associée d'une mutation de *MYD88* et la correspondance diagnostique sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 19 : Mutations somatiques retrouvées par séquençage haut débit dans le domaine C-terminal de *CXCR4* parmi les échantillons de la cohorte (le patient double muté *CXCR4* est signalé par un *)

Diagnostic	Infiltration tumorale médullaire (%)	Mutation <i>MYD88</i>	Mutation <i>CXCR4</i>			
			Type de mutation	Variation nucléotidique	Protéine	VAF
M-MGUS	7	L265P	Framshift variant	c.952dup	p.T318Nfs*26	1
sMW*	27	L265P	Framshift variant	c.959_960delCA	p.V320Efs*23	1,9
MW	33	L265P	Framshift variant	c.1008_1018delCAGATGAATGT	p.H337Ffs*3	5
sMW	37	L265P	Framshift variant	c.1010_1011delAT	p.H337Lfs*6	11,3
sMW*	27	L265P	Framshift variant	c.1013delG	p.S338Yfs*28	1,9
M-MGUS	4	L265P	Framshift variant	c.1013delG	p.S338Yfs*28	2,2
MW	40	L265P	Stop gained	c.1013C>G	p.S338*	14
MW	42	L265P	Stop gained	c.1013C>G	p.S338*	16
M-MGUS-IRD	7	L265P	Stop gained	c.1013C>G	p.S338*	1,1
LPL à IgG	25	L265P	Stop gained	c.1013C>G	p.S338*	3,5
sMW	34	L265P	Framshift variant	c.1021delA	p.S341Pfs*25	9,7
M-MGUS	8	L265P	Framshift variant	c.1021delA	p.S341Pfs*25	3,1

La mutation S338X retrouvée faiblement positive chez un patient en PCR-AS *CXCR4* S338X n'a pas été détectée par séquençage haut débit. Ceci confirme le manque de fiabilité de cette technique et justifie son abandon.

IV.7. Intégration de l'ensemble des résultats biologiques et interprétation

L'ensemble des résultats de la cohorte, recrutée pour présence d'un pic IgM à l'EPS (79 patients), a été représenté sur une *heatmap* (ou carte de chaleur) à la Figure 59 (présente également à l'Annexe 7).

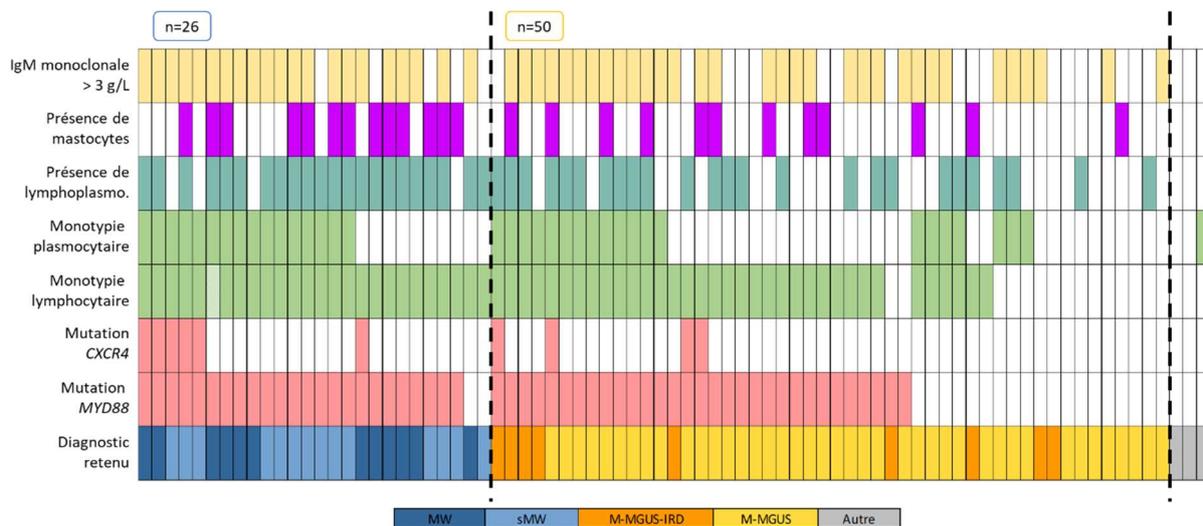


Figure 59 : Fréquence des mutations de *MYD88* et *CXCR4*, d'une population monotypique lymphocytaire ou plasmocytaire, de la présence de lymphoplasmocytes et de mastocytes en cytologie et d'un taux d'IgM monoclonale > 3 g/L selon le diagnostic. Rectangle coloré : signe présent, rectangle hachuré : cas douteux, rectangle blanc : signe absent. Un code couleur permet d'identifier le diagnostic retenu comme indiqué sur la figure.

En considérant les groupes de patients MW, M-MGUS et autres lymphomes, nous avons établi que la présence de la double population (lymphocytes et plasmocytes) monotypique était fortement associée au statut *MYD88* muté avec une valeur prédictive positive (VPP) de 88% ($p=0.014$, test du Chi2). De plus, la spécificité pour le diagnostic de MW de l'association double monotypie et statut *MYD88* muté était de 80% en regard de la population *MYD88*^{WT} (Figure 60).

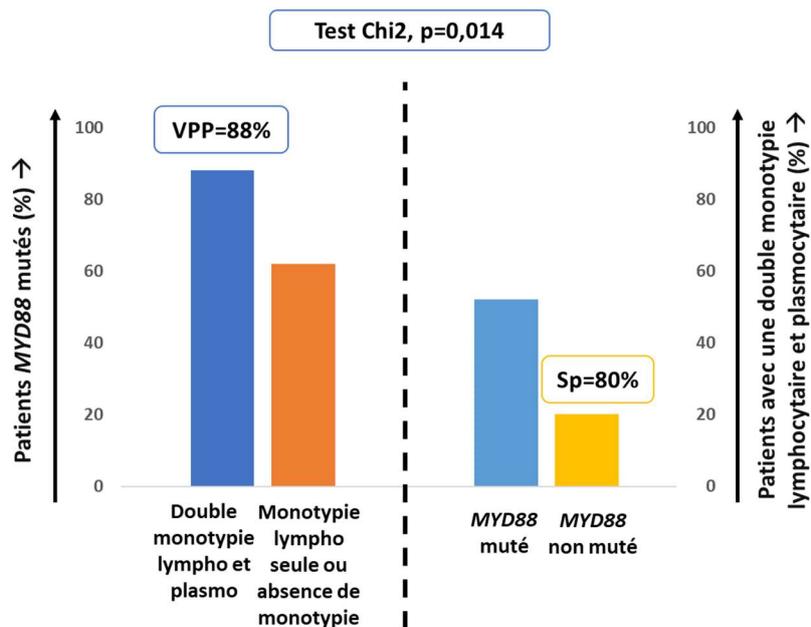


Figure 60 : Fréquence des monotypies lymphocytaires et plasmocytaires selon le statut *MYD88* (VPP : Valeur Prédictive Positive, Sp : Spécificité)

Une mutation de *CXCR4* était retrouvée dans 6/26 (23%) des cas de MW, dans 4/50 (8%) des M-MGUS et dans 1/3 (33%) des LPL non-IgM. Parmi les sujets mutés *CXCR4*, 7/10 (70%) présentaient un clone plasmocytaire et tous (10/10) étaient associés à la présence d'un clone lymphocytaire et d'une mutation de *MYD88*. En considérant les 28 patients (MW et M-MGUS) qui possédaient la double monotypie lymphocytaire et plasmocytaire et un statut *MYD88* muté, 7/28 (25%) étaient mutés *CXCR4*.

Dans la population qui présentait un clone plasmocytaire, 8/40 (20%) était muté *CXCR4* contre 3/44 (7%) parmi les sujets sans clone plasmocytaire. Aucune association entre la présence d'une monotypie plasmocytaire et d'une mutation du gène *CXCR4* n'a été mise en évidence ($p=0.074$, test Chi2).

Dans la population mutée *CXCR4* de notre cohorte, nous avons évalué le taux d'IgM monoclonale ainsi que le degré d'infiltration médullaire, la présence de symptômes et notamment d'un syndrome d'hyperviscosité par rapport à la population non mutée. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 20 : Comparaison des taux d'IgM monoclonale, de l'infiltration médullaire tumorale, des manifestations cliniques et de la présence d'un syndrome d'hyperviscosité chez les sujets mutés et non mutés *CXCR4* de la série de patients

	Sujets mutés <i>CXCR4</i> (n=11)	Sujets non mutés <i>CXCR4</i> (n=73)
Taux d'IgM monoclonale	Moyenne = 15.7 g/L Médiane = 14.4 g/L	Moyenne = 9 g/L Médiane = 6.4 g/L
Pourcentage d'infiltration médullaire tumorale	Médiane = 27% Min = 4.5%, Max = 41.8%	Médiane = 1% Min = 0%, Max = 77.2%
Présence de manifestations cliniques	4/11 (36%)	20/73 (27%)
Présence d'un syndrome d'hyperviscosité	2/11 (18%)	0/73 (0%)

Au diagnostic, 4/11 (36%) des patients mutés *CXCR4* ont bénéficiés d'une prise en charge thérapeutique, parmi eux : 2 MW étaient sous DRC, 1 MW sous R-bendamustine et 1 M-MGUS sous chloraminophène en monothérapie. Dans le reste de la cohorte, 20/73 (27%) des patients ont été traités au diagnostic. Sur l'ensemble des patients de la série 1/84 (1%) a reçu de l'ibrutinib en monothérapie. Il s'agissait d'un patient atteint de MW (MYD88^{L265P} et *CXCR4*^{WT}) en échec après un traitement par rituximab avec persistance d'une neuropathie anti-MAG invalidante satellite de la MW.

V. Discussion

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'apport du phénotypage plasmocytaire en association au phénotypage lymphocytaire dans le diagnostic de la MW et de compléter ces données par l'exploration des mutations des gènes *MYD88* et *CXCR4*. Cette étude prospective a été réalisée sur une cohorte de 79 patients sélectionnés pour bilan de pic IgM détecté à l'EPS ayant bénéficié d'un myélogramme avec immunophénotypage lymphocytaire + plasmocytaire et de la recherche de mutation de *MYD88* entre 2012 et 2019 au CHU de Limoges.

Le travail de reclassification diagnostique, combinant les données de la relecture des myélogrammes et du phénotype lymphocytaire obtenu par cytométrie en flux a permis d'identifier 26 MW dont 12 formes symptomatiques et 14 *smoldering*, 50 M-MGUS parmi lesquels 9 M-MGUS-IRD, et 3 lymphomes de bas grade non LLC (1 LZM et 2 LNH-B). Les 5 sujets LPL et G-MGUS, ainsi que la cohorte de 30 myélomes ont permis une analyse comparative des profils immunophénotypiques et moléculaires. Le phénotype des plasmocytes monotypiques de l'entité MW (M-MGUS et MW) s'est avéré très proche de celui des plasmocytes normaux et distinct de celui des plasmocytes de myélome. Cette analyse a également permis de démontrer une forte association entre la présence de la double monotypie lymphocytaire et plasmocytaire et la mutation du gène *MYD88*. La présence de cette double monotypie était en faveur du diagnostic de MW avec une spécificité de 80%. De plus, lors de la présence du triptyque double clone lymphocytaire et plasmocytaire et statut *MYD88* muté, on retrouvait une mutation de *CXCR4* dans 25% des cas.

V.1. Recrutement de la cohorte

La MW représente seulement 1 à 2% des hémopathies malignes. La constitution de cohortes représentatives de cette population est donc une tâche complexe. Notre échantillonnage était centré sur la présence d'une exploration immunophénotypique médullaire (lymphocytaire et plasmocytaire) au diagnostic, en place au CHU de Limoges depuis 2012, et la non-opposition des patients à la recherche biomédicale. Ces restrictions de sélection ont toutefois permis le recrutement de 79 patients. Parmi eux, les lymphomes IgM-sécrétant non MW (1 LZM et 2 LNH-B) étaient faiblement représentés. Une série plus importante et plus complète de diagnostics différentiels de l'entité MW tels que des lymphomes du manteau, des LLC, ... (avec pic IgM) pourrait constituer un contrôle solide des résultats de notre série.

Lors du recueil de données, un certain nombre d'informations étaient manquantes. Celles-ci étaient soit inaccessibles, soit inhérentes à la réalisation technique des analyses au laboratoire (échec de marquage CD19/CD56 d'un échantillon présentant un clone plasmocytaire par exemple). Certaines ont néanmoins pu être complétées, comme la recherche des mutations du gène *MYD88*. Il est à noter que tous les supports nécessaires à ce travail (frottis médullaires, résultats de cytométrie au format LMD et échantillon d'ADN) étaient disponibles pour les 84 patients (critère de recrutement).

V.2. Recueil des échantillons

La ponction médullaire constitue le prélèvement de choix pour le diagnostic de la MW. En effet, l'infiltration médullaire par le clone tumoral est une des caractéristiques de la maladie. Néanmoins, d'autres sites peuvent également être le siège de la prolifération maligne tels que les ganglions ou la rate. Dans notre étude, la relecture cytologique et l'immunophénotypage lymphocytaire et plasmocytaire ont été réalisées sur ponction médullaire.

En revanche, l'analyse moléculaire a été effectuée sur plusieurs types de prélèvements. La majorité 73/84 (87%) a été réalisée sur ADN de moelle osseuse, une autre partie (10/84 (12%)) sur ADN sanguin. La présence du clone tumoral dans ce compartiment est rare dans la MW. Cependant, 4/10 (40%) des prélèvements sanguins présentaient une mutation de *MYD88* et 1/10 (10%) correspondait à un diagnostic de G-MGUS (pas de mutations de *MYD88* décrites à ce jour dans ce cas (32,34,121)). Un risque de faux négatif pour la recherche de *MYD88* et par conséquent de *CXCR4* est donc admis pour les ADN sanguins restant (5/84 (6%)).

Le dernier échantillon utilisé était une ponction ganglionnaire, elle correspondait au diagnostic de LZM dont les localisations extra-médullaires suivantes avaient préalablement été décrites : splénique, pleurale et ganglionnaire. De plus, cet échantillon présentait une clonalité B positive en biologie moléculaire.

V.3. Revue diagnostique

Notre approche quant à la reclassification des diagnostics de la cohorte s'est voulue très proche de la démarche d'interprétation des résultats des myélogrammes réalisée en routine au laboratoire d'hématologie. Nous avons choisi le seuil d'infiltration médullaire distinguant l'entité M-MGUS de la MW à 10%, en regard des données récentes de la littérature et des recommandations des groupes de pairs (*cf.* consensus *mSMART* 2016) (5,81,82,114).

La relecture cytologique effectuée de façon concertée et objective grâce à la grille de relecture et a permis d'exclure les échantillons de moelle hémodilués. De la même façon, le très grand nombre de cellules analysées en CMF a permis une caractérisation plus juste de l'infiltrat tumoral, souvent faiblement représenté dans l'échantillon et difficilement observable en cytologie. En outre, il a été largement décrit que la présence d'une symptomatologie clinique quelle qu'elle soit, signalait le stade de MW. Cependant, suite au choix du seuil de 10% comme critère diagnostique majeur et de la description récente de l'entité *IgM-related disorder* (4,82), nous avons séparé l'entité M-MGUS en deux sous-groupes selon l'expression clinique des patients. Il est à noter que le seuil de 10% revêt un intérêt pratique mais reste arbitraire. En effet, les explorations tant phénotypiques que moléculaires mettent en évidence qu'il s'agit de la même entité biologique avec un degré variable d'infiltration de l'organisme.

V.4. Analyse immunophénotypique du clone lymphoplasmocytaire

Le phénotype des lymphocytes B clonaux majoritairement retrouvé était le suivant : CD19+, CD20+, CD5- avec une chaîne légère κ associée, comme décrit dans la littérature sur la MW

(73,74,122). Ce clone B a été retrouvé dans tous les cas de MW et 70% des M-MGUS. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par *Paiva et al.* (123) sur une cohorte de 51 patients composée de 31 MW et 20 M-MGUS qui rapportait en clone B dans 97% et 75% des cas respectivement. Le score de Matutes associé, lorsque le tube 2 (Tableau 6) du panel lymphocytaire était réalisé, compris entre 0 et 3 concordait également avec les données de la littérature (69). Nous savons que le marqueur CD38 est exprimée par le clone B dans environ 1/3 des cas de MW (69,122). Puisque la maladie se caractérise par un *continuum* de différenciation lymphoplasmocytaire, du lymphocyte mûr CD38+ au plasmocyte mature CD38Fort, nous avons émis l'hypothèse d'un niveau d'expression du CD38 différent sur les lymphocytes B clonaux selon le stade de la maladie. *In fine*, son expression était variable dans tous les groupes diagnostiques et ne permettait pas de les distinguer ($p = 0.124$ au risque de 5%, test ANOVA). Les LPL, qui correspondent à la même entité que la MW présentaient logiquement un phénotype B similaire. Les G-MGUS, faiblement représentés (1 clone B sur 2 cas de G-MGUS) également.

Le profil immunophénotypique des plasmocytes clonaux de la série de 79 patients était principalement CD19+, CD20- et CD56- avec une chaîne légère κ . La chaîne légère du clone plasmocytaire correspondait à celle du clone B dans tous les cas. Cette notion est en accord avec le fait que le clone tumoral présent dans la moelle osseuse est unique, de type lymphoplasmocytaire, et possiblement détecté dans deux compartiments cellulaires distincts : lymphocytaire et plasmocytaire. Le phénotype plasmocytaire de l'entité MW (M-MGUS et MW) s'est avéré très proche de celui des plasmocytes normaux (CD19+, CD20-, CD56-) et très différent de celui des plasmocytes de myélome (CD19-, CD20-, CD56+). Ces résultats avaient été précédemment rapportés par *Paiva* et son équipe en 2014 (74). De façon similaire au clone B, le clone plasmocytaire des LPL et G-MGUS était peu représenté. Proche de celui des plasmocytes de MW, il présentait un phénotype CD19-, CD20- et CD56-.

Les travaux de *Paiva et al.* (74,123) sur le phénotype du clone lymphoplasmocytaire de la MW rapportaient que la modification du ratio : clone lymphocytaire B / population lymphocytaire B polytypique, était corrélée à l'évolution de la maladie. La proportion de cellules clonales augmentait du stade M-MGUS au stade MW et inversement, la population polytypique diminuait. De plus, une hausse du pourcentage de plasmocytes monotypiques était mise en évidence entre le stade M-MGUS et MW. Les résultats issus de ces constatations ne permettaient cependant pas de distinguer strictement les M-MGUS des sMW et MW. Dans notre étude, nous avons également calculé ce ratio pour chacun des groupes diagnostiques, ainsi que les deux ratios suivants :

- clone plasmocytaire / population plasmocytaire polytypique
- clone plasmocytaire / clone lymphocytaire correspondant

Dans tous les cas, le ratio calculé ne permettait pas de différencier M-MGUS des sMW, MW et autres lymphomes. Au cours de ces mêmes travaux, *Paiva et al.* (74) ont décrit un phénotype B caractéristique de la MW en s'appuyant sur une cohorte de 244 patients au diagnostic (M-MGUS, sMW et MW). L'immunophénotype en question était le suivant : CD22Faible, CD23-, CD25+, CD27+, IgM+, avec absence d'expression des marqueurs CD5, CD10, CD11c et CD103 dans plus de 89% des cas, ce qui permettait la distinction avec les

autres syndromes lymphoprolifératifs (sauf le LZM). La question d'un mélange d'anticorps spécifique pour le diagnostic de la MW pourrait être discutée.

L'ensemble des analyses de cytométrie en flux a été réalisé au cours de l'activité de routine du laboratoire entre 2012 et 2019. Les données obtenues ont pu être rejouées grâce au format de stockage LMD, toutefois elles n'ont pu être complétées. En effet, le marquage du CD20 dans le second tube du panel plasmocytaire n'a été ajouté qu'en 2014, ainsi, sur 37 clones plasmocytaires identifiés au sein de la cohorte, seulement 28 en ont bénéficié. De plus, le résultat du marquage CD19/CD56 était ininterprétable pour un sujet, réduisant l'effectif à 36 échantillons pour cette donnée. De même, la réalisation du tube 2 du panel lymphocytaire n'était pas systématique et principalement conditionnée par la présence d'un clone B, le calcul du score de Matutes a donc été effectué sur 37/84 (44%) des échantillons.

Au sein du laboratoire de cytométrie en flux, deux références de clones de CD38 sont utilisées dans le panel plasmocytaire (CD38 FITC Immunotech® - clone T16 et CD38 PECy7 Immunotech® - clone LS 198-4-3). Le marquage peut par conséquent être différent d'un mélange d'anticorps à l'autre. Néanmoins, le fenêtrage des plasmocytes sur le CD38/CD138 est aisé dans la plupart des cas et l'on peut supposer qu'il reste uniforme dans le panel.

V.5. Analyse moléculaire : exploration des mutations de *MYD88* et *CXCR4*

La technique de PCR spécifique d'allèle *MYD88* L265P fait partie de l'activité de routine du secteur de biologie moléculaire et permet un dépistage fiable de la mutation L265P. Associée au séquençage Sanger du domaine TIR de *MYD88* elle présente une excellente spécificité et sensibilité. La mutation L265P de *MYD88* a été détectée chez 23/26 (88%) des MW et 1/3 (33%) des LPL non-IgM soit 24/29 (83%) de tous les LPL (IgM, IgG et IgA). *Treon et al.* (31) avaient rapporté des résultats similaires en 2012 : la mutation L265P était retrouvée chez 49/54 (91%) des MW et 3/3 des LPL non-IgM soit 52/57 (91%) des LPL. Concernant les M-MGUS, la littérature décrit une mutation L265P dans 50 à 80% des cas (32,33), ici, elle était présente chez 31/50 (62%) des patients atteints de M-MGUS. Les mutations V217F et S219C de *MYD88* identifiées en Sanger chez un cas de MW et un cas de LPL à IgG respectivement ont précédemment été décrites par *Ngo et al.* (24) dans les DLBCL.

La seconde technique de PCR spécifique d'allèle ciblant la mutation S338X de *CXCR4* a permis l'identification d'une mutation non-sens c.1013C>G chez un sujet MW parmi les 13 échantillons testés. Cette mutation a été vérifiée par séquençage Sanger et haut débit. 11/13 (85%) des échantillons ne présentaient pas de mutations, ces résultats ont également été confirmés *a posteriori* par séquençage haut débit. Toutefois, pour un cas de M-MGUS-IRD, la positivité S338X en PCR-AS n'a pu être confirmée ni en Sanger, ni par séquençage haut débit. Ce résultat faux positif et l'absence de contrôles à la fois négatifs et positifs, a conduit à l'abandon de la méthode testée, jugée insuffisamment fiable.

L'exploration des mutations concernant la partie C-terminale de *CXCR4* par séquençage haut débit au moyen de la technologie Illumina® a permis la détection d'une mutation dans 6/26 (23%) des cas de MW. Dans cette population, les études de *Poulain et al.* (49), *Treon et al.* (77), *Hunter et al.* (36) et *Schmidt et al.* (47) rapportaient une fréquence de mutation de *CXCR4* de 24/98 (24%), 8/30 (27%), 51/175 (29%) et 17/47 (36%) respectivement. La mutation la plus fréquemment retrouvée, S338X, était présente parmi 2/26 (8%) des sujets MW comme rapporté par *Treon et al.* (77) (6/175 (3%)) et *Poulain et al.* (49) (8/98 (8%)). Parmi la population des M-MGUS, 4/50 (8%) des sujets présentaient un statut *CXCR4* muté, cette fréquence est plus faible que dans certains écrits, comme celui de *Xu et al.* (48) qui décrivait 2/12 (17%) de cas mutés sur un échantillonnage cependant moins important. Enfin, la mutation S338X de *CXCR4* a été identifiée dans 1/3 (33%) de LPL non-IgM, résultat vraisemblable puisque cette entité est très proche de la MW ou LPL à IgM. De plus, elle n'a pas été retrouvée parmi les deux sujets G-MGUS, rarement étudiés dans ce contexte, toutefois en accord avec les résultats de *Roccaro et al.* qui ne rapportaient aucune mutation S338X chez 22 cas de MGUS à IgG et IgA (50). Toutes les mutations retrouvées dans cette étude étaient de type *frameshift* ou *stop gained* avec une majorité de *frameshift* (8/12 (67%) contre 4/12 (33%)), comme décrit dans la littérature (36,47–49,77). Comme la mutation S338X, les mutations T318Nfs*, V320Efs* et S341Pfs* avaient préalablement été identifiées par *Treon et al.* en 2014 (77). A notre connaissance, aucune mutation en position 337 n'a été décelée à ce jour (H337F et H337L), de même que la mutation *frameshift* S338Y qui correspond à la délétion d'une base G, même si de nombreuses indel (insertions/délétions) d'une seule base ont été décrites à cette position (47–49).

En 2014, *Treon et al.* (77) dépeignaient une présentation clinique plus agressive chez les patients atteints de MW mutés *CXCR4* que chez les sujets non mutés. Dans leur étude, les sujets *CXCR4* mutés présentaient une infiltration médullaire plus importante, des taux d'IgM plus élevés et un syndrome d'hyperviscosité nécessitant une prise en charge thérapeutique. Dans notre cohorte de 84 patients, l'infiltration médullaire des sujets mutés *CXCR4* (24% en moyenne) était supérieure à celles du reste de la cohorte (moyenne de 9%). De même, les taux d'IgM (moyenne de 15.7 g/L contre 7.9 g/L) et la proportion de sujets symptomatiques (36% contre 27%) au diagnostic était plus importante. Au sein de la cohorte 2/84 (2%) sujets présentaient un syndrome d'hyperviscosité ayant nécessité un traitement, ils étaient tous les 2 mutés *CXCR4*. Ces données, qui doivent être confirmées sur de plus grandes séries de patients, suggèrent un rôle péjoratif des mutations de *CXCR4* dans la présentation et l'évolution clinique de la maladie.

Au diagnostic, 4/11 (36%) des patients mutés *CXCR4* ont bénéficié d'une prise en charge thérapeutique contre 20/73 (27%) dans le reste de la cohorte. Parmi les 4 sujets traités, 2 MW étaient sous DRC, 1 MW sous R-bendamustine et 1 M-MGUS sous chloraminophène en monothérapie. Aucun d'eux n'a bénéficié d'un traitement par ibrutinib. L'évaluation de l'efficacité de cet inhibiteur en présence du statut *CXCR4* muté n'a par conséquent pas pu être réalisée (106).

A l'ère du séquençage de nouvelle génération, cette étude a permis d'expérimenter une technique « maison », visant à séquencer une petite zone d'intérêt chez un grand nombre de

patients. Cette méthode, à la fois simple à réaliser (constitution des bibliothèques en 2 PCR) et très économique, a fourni un séquençage de très bonne qualité (>Q30). Elle pourrait éventuellement être optimisée par la mise au point d'une PCR multiplex des 2 régions cibles de *CXCR4*. Toutefois, l'identification de contrôles positifs (ADN patients, screening de lignée ou ADN contrôles commerciaux) seront nécessaires en tant que contrôle de qualité interne (CQI) pour une utilisation en routine. Deux témoins négatifs non tumoraux ont été utilisés dans cette série. La présence de la mutation S338X (VAF : 14%) pour un cas de MW a été vérifiée par séquençage Sanger (et PCR-AS *CXCR4*) mais l'utilisation d'un témoin positif avec un VAF faible (environ 1%) permettrait de valider la série et faciliterait également son interprétation. En effet, nous avons fixé un seuil de significativité de 1% (VAF) de façon arbitraire, mais l'expression de *CXCR4* par les cellules tumorales peut être sous-clonale (VAF très faible). De plus, le risque de générer des erreurs de séquence au cours de la constitution des bibliothèques par PCR « maison », bien que très faible grâce à l'utilisation d'une enzyme de haute-fidélité (taux d'erreur Taq Phusion® : $4,4 \cdot 10^{-7}$), existe et ces erreurs peuvent être sélectionnées par le *variant caller* avec un score de qualité acceptable. La réalisation d'une fusion des *reads* double-sens ou « *merging* » a permis d'éliminer une partie du bruit de fond dues aux erreurs de séquençage mais là encore un contrôle de qualité serait nécessaire afin d'uniformiser l'ensemble des résultats. À l'avenir, il serait possible d'envisager un séquençage simultané de *MYD88* (domaine TIR) et de *CXCR4* (partie C-terminale). En effet, la mutation *MYD88* serait présente dans l'ensemble des cellules tumorales de MW puisqu'elle est à l'origine de la lymphomagenèse. Cette notion permettrait de s'affranchir de l'hémodilution due au prélèvement et d'obtenir des VAF de *CXCR4* plus justes.

VI. Conclusion et perspectives

La collection des données d'une telle cohorte a constitué une véritable opportunité d'explorer plus profondément la MW, hémopathie peu fréquemment retrouvée dans la population générale et dont le diagnostic reste encore difficile à établir aujourd'hui. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'apport d'un phénotypage plasmocytaire à celui réalisé communément sur les lymphocytes médullaires dans le cadre du diagnostic de MW. Nous avons établi que la présence de la double population monotypique lymphocytaire et plasmocytaire était fortement associée au statut *MYD88* muté et très en faveur du diagnostic de MW. De plus, la caractérisation du statut mutationnel de *CXCR4* a permis d'identifier une mutation de ce gène dans un quart des cas présentant le tryptique diagnostique (double monotypie lymphocytaire et plasmocytaire et statut *MYD88* muté). L'analyse de ce *continuum* de différenciation lymphoplasmocytaire qui caractérise la MW en cytologie, mais aussi en cytométrie et en biologie moléculaire confirme qu'il existe bien une entité pathologique unique qui se décline en plusieurs stades d'évolution du M-MGUS à la MW.

Ce travail a également permis d'évaluer les performances de la technique de séquençage haut débit à partir de librairies « maison ». A l'avenir, d'autres explorations de ce type peuvent être envisagées au laboratoire du CHU de Limoges du fait de la facilité de réalisation et du coût de la technique. De plus, l'identification concomitante des mutations des gènes *CXCR4* et *MYD88* serait pertinente dans le cadre de la mise en place d'un traitement par ibrutinib. En effet, le statut *CXCR4* muté entraînant un temps de réponse au traitement plus long et l'absence de mutation de *MYD88*, une efficacité moindre (124), la décision thérapeutique pourrait être guidée par l'analyse moléculaire dans ce cas précis.

Références bibliographiques

1. Waldenström JAN. Incipient myelomatosis or "essential" hyperglobulinemia with fibrinogenopenia—a new syndrome? *Acta Med Scand.* 1944;117(3-4):216–247.
2. Sapparapu G, Planque S, Mitsuda Y, McLean G, Nishiyama Y, Paul S. Constant Domain-regulated Antibody Catalysis. *J Biol Chem.* 2012;287(43):36096-104.
3. Weltgesundheitsorganisation. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., éditeurs. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. 585 p. (World Health Organization classification of tumours).
4. 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.* 2003;30(2):110-5.
5. Kapoor P, Ansell SM, Fonseca R, Chanan-Khan A, Kyle RA, Kumar SK, et al. Diagnosis and Management of Waldenström Macroglobulinemia: Mayo Stratification of Macroglobulinemia and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Guidelines 2016. *JAMA Oncol.* 2017;3(9):1257.
6. Wang H, Chen Y, Li F, Delasalle K, Wang J, Alexanian R, et al. Temporal and geographic variations of Waldenström macroglobulinemia incidence: A large population-based study. *Cancer.* 2012;118(15):3793-800.
7. Castillo JJ, Olszewski AJ, Kanan S, Meid K, Hunter ZR, Treon SP. Overall survival and competing risks of death in patients with Waldenström macroglobulinaemia: an analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database. *Br J Haematol.* 2015;169(1):81-9.
8. Kristinsson SY, Bjorkholm M, Goldin LR, McMaster ML, Turesson I, Landgren O. Risk of lymphoproliferative disorders among first-degree relatives of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia patients: a population-based study in Sweden. *Blood.* 2008;112(8):3052-6.
9. Steingrimsson V, Lund SH, Turesson I, Goldin LR, Bjorkholm M, Landgren O, et al. Population-based study on the impact of the familial form of Waldenström macroglobulinemia on overall survival. *Blood.* 2015;125(13):2174-5.
10. Kyle RA. Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood.* 2003;102(10):3759-64.
11. Manasanch EE, Kristinsson SY, Landgren O. Etiology of Waldenström Macroglobulinemia: Genetic Factors and Immune-related Conditions. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013;13(2):194-7.
12. McMaster ML, Goldin LR, Bai Y, Ter-Minassian M, Boehringer S, Giambarresi TR, et al. Genomewide Linkage Screen for Waldenström Macroglobulinemia Susceptibility Loci in High-Risk Families. *Am J Hum Genet.* 2006;79(4):695-701.
13. Royer RH, Koshiol J, Giambarresi TR, Vasquez LG, Pfeiffer RM, McMaster ML. Differential characteristics of Waldenström macroglobulinemia according to patterns of familial aggregation. *Blood.* 2010;115(22):4464-71.

14. Richard Y, Galanaud P. Signaux de la coopération T-B et production d'anticorps. *médecine/sciences*. 1995;11(5):691.
15. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):251-62.
16. Wagner SD, Martinelli V, Luzzatto L. Similar patterns of V kappa gene usage but different degrees of somatic mutation in hairy cell leukemia, prolymphocytic leukemia, Waldenstrom's macroglobulinemia, and myeloma. *Blood*. 1994;83(12):3647-53.
17. Sahota SS, Forconi F, Ottensmeier CH, Provan D, Oscier DG, Hamblin TJ, et al. Typical Waldenstrom macroglobulinemia is derived from a B-cell arrested after cessation of somatic mutation but prior to isotype switch events. *Blood*. 2002;100(4):1505-7.
18. Sahota SS, Forconi F, Ottensmeier CH, Stevenson FK. Origins of the malignant clone in typical Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003;30(2):136-41.
19. Treon SP, Hunter ZR, Castillo JJ, Merlini G. Waldenström Macroglobulinemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014;28(5):945-70.
20. Hunter ZR, Manning RJ, Hanzis C, Ciccarelli BT, Ioakimidis L, Patterson CJ, et al. IgA and IgG hypogammaglobulinemia in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Haematologica*. 2010;95(3):470-5.
21. Ghobrial IM, Gertz MA, Fonseca R. Waldenström macroglobulinaemia. *Lancet Oncol*. 2003;4(11):679-85.
22. Nishiya T, Kajita E, Horinouchi T, Nishimoto A, Miwa S. Distinct roles of TIR and non-TIR regions in the subcellular localization and signaling properties of MyD88. *FEBS Lett*. 2007;581(17):3223-9.
23. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(8):546-58.
24. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470(7332):115-9.
25. Tassia MG, Whelan NV, Halanych KM. Toll-like receptor pathway evolution in deuterostomes. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114(27):7055-60.
26. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.
27. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004;16(1):3-9.
28. Lin S-C, Lo Y-C, Wu H. Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. 2010;465(7300):885-90.
29. Kaileh M, Sen R. NF- κ B function in B lymphocytes. *Immunol Rev*. 2012;246(1):254-71.
30. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. Phosphorylation of I kappa B alpha precedes but is not sufficient for its dissociation from NF-kappa B. *Mol Cell Biol*. 1995;15(3):1302-11.
31. 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):826-33.

32. 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*. 2013;27(8):1722-8.
33. 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*. 2013;121(13):2522-8.
34. 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*. 2013;121(11):2051-8.
35. Poulain S, Roumier C, Decambron A, Renneville A, Herbaux C, Bertrand E, et al. MYD88 L265P mutation in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2013;121(22):4504-11.
36. Hunter ZR, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood*. 2014;123(11):1637-46.
37. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggini A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(8):1403-12.
38. 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*. 2013;27(1):183-9.
39. Voies de signalisation MYD88 médiée [Internet]. Disponible sur: sinobiological.com/il10-signaling-pathway.html
40. Treon SP, Xu L, Hunter Z. MYD88 Mutations and Response to Ibrutinib in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2015;373(6):584-6.
41. Wegner SA, Ehrenberg PK, Chang G, Dayhoff DE, Sleeker AL, Michael NL. Genomic Organization and Functional Characterization of the Chemokine Receptor CXCR4, a Major Entry Co-receptor for Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Biol Chem*. 1998;273(8):4754-60.
42. Werner L, Guzner-Gur H, Dotan I. Involvement of CXCR4/CXCR7/CXCL12 Interactions in Inflammatory Bowel Disease. *Theranostics*. 2013;3(1):40-6.
43. Ngo HT, Leleu X, Lee J, Jia X, Melhem M, Runnels J, et al. SDF-1/CXCR4 and VLA-4 interaction regulates homing in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2008;112(1):150-8.
44. Structure tridimensionnelle de CXCR4 et principales mutations touchant sa partie C-terminale retrouvées dans la MW et le syndrome de WHIM [Internet]. Disponible sur: <http://www.waldenstroms.com/bing-center-spotlight/280-bing-center-discovers-highly-prevalent-mutations-in-the-cxcr4-gene-in-patients-with-waldenström-s-macroglobulinemia>

45. Scala S. Molecular Pathways: Targeting the CXCR4-CXCL12 Axis-Untapped Potential in the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res.* 2015;21(19):4278-85.
46. McDermott DH, Murphy PM. WHIM syndrome: Immunopathogenesis, treatment and cure strategies. *Immunol Rev.* 2019;287(1):91-102.
47. Schmidt J, Federmann B, Schindler N, Steinhilber J, Bonzheim I, Fend F, et al. MYD88 L265P and CXCR4 mutations in lymphoplasmacytic lymphoma identify cases with high disease activity. *Br J Haematol.* 2015;169(6):795-803.
48. Xu L, Hunter ZR, Tsakmaklis N, Cao Y, Yang G, Chen J, et al. Clonal architecture of CXCR4 WHIM-like mutations in Waldenström Macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2016;172(5):735-44.
49. Poulain S, Roumier C, Venet-Caillault A, Figeac M, Herbaux C, Marot G, et al. Genomic Landscape of CXCR4 Mutations in Waldenström Macroglobulinemia. *Clin Cancer Res.* 2016;22(6):1480-8.
50. Roccaro AM, Sacco A, Jimenez C, Maiso P, Moschetta M, Mishima Y, et al. C1013G/CXCR4 acts as a driver mutation of tumor progression and modulator of drug resistance in lymphoplasmacytic lymphoma. *Blood.* 2014;123(26):4120-31.
51. Nguyen-Khac F, Lambert J, Chapiro E, Grelier A, Mould S, Barin C, et al. Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica.* 1 avr 2013;98(4):649-54.
52. Monge J, Braggio E, Ansell SM. Genetic Factors and Pathogenesis of Waldenström's Macroglobulinemia. *Curr Oncol Rep.* 2013;15(5):450-6.
53. Hunter ZR, Yang G, Xu L, Liu X, Castillo JJ, Treon SP. Genomics, Signaling, and Treatment of Waldenström Macroglobulinemia. *J Clin Oncol.* 2017;35(9):994-1001.
54. Baer C, Dicker F, Kern W, Haferlach T, Haferlach C. Genetic characterization of MYD88-mutated lymphoplasmacytic lymphoma in comparison with MYD88-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2017;31(6):1355-62.
55. Okosun J, Bődör C, Wang J, Araf S, Yang C-Y, Pan C, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet.* 2014;46(2):176-81.
56. Lefebvre C, Callet-Bauchu E, Chapiro E, Nadal N, Penther D, Antoine-Poirel H. Cytogenetics in the management of lymphomas and lymphoproliferative disorders in adults and children: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin (Paris).* 2016;74(5):568-87.
57. Schop RFJ, Jalal SM, Van Wier SA, Ahmann GJ, Bailey RJ, Kyle RA, et al. Deletions of 17p13.1 and 13q14 are uncommon in Waldenström macroglobulinemia clonal cells and mostly seen at the time of disease progression. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;132(1):55-60.
58. Bourdeaut F, Bièche I. Chromatin remodeling defects and cancer: the SWI/SNF example. *Bull Cancer (Paris).* 2012;99(12):1133-40.

59. Singh A, Eckardt KU, Zimmermann A, Götz KH, Hamann M, Ratcliffe PJ, et al. Increased plasma viscosity as a reason for inappropriate erythropoietin formation. *J Clin Invest*. 1993;91(1):251-6.
60. Leblond V, Tournilhac O, Morel P. Maladie de Waldenström ou macroglobulinémie. *EMC - Hématologie*. 2006;1(2):1-10.
61. Simon L, Fitsiori A, Lemal R, Dupuis J, Carpentier B, Boudin L, et al. Bing-Neel syndrome, a rare complication of Waldenström macroglobulinemia: analysis of 44 cases and review of the literature. A study on behalf of the French Innovative Leukemia Organization (FILO). *Haematologica*. 2015;100(12):1587-94.
62. Varettoni M, Defrancesco I, Diamanti L, Marchioni E, Farina LM, Pichiecchio A. Bing-Neel Syndrome: illustrative cases and comprehensive review of the literature. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2017;9(1):e2017061.
63. Henry B, Néel A, Barbarot S, Masseur A, Hamidou M. Le syndrome de Schnitzler. *Rev Médecine Interne*. 2013;34(4):224-9.
64. Kwaan H, Bongu A. The Hyperviscosity Syndromes. *Semin Thromb Hemost*. 1999;25(02):199-208.
65. Schwab PJ, Fahey JL. Treatment of Waldenström's Macroglobulinemia by Plasmapheresis. *N Engl J Med*. 1960;263(12):574-9.
66. Eby CS. Bleeding and Thrombosis Risks in Plasma Cell Dyscrasias. *Hematology*. 2007;2007(1):158-64.
67. Hivert B, Caron C, Petit S, Charpy C, Fankam-Siaka C, Lecocq S, et al. Clinical and prognostic implications of low or high level of von Willebrand factor in patients with Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2012;120(16):3214-21.
68. Winfield JB. Cryoglobulinemia. *Hum Pathol*. 1983;14(4):350-4.
69. Poulain S, Wemeau M, Balkaran S, Hivert B, Hautecoeur A, Rossignol J, et al. Macroglobulinémie de Waldenström. *Rev Médecine Interne*. 2010;31(5):385-94.
70. Gertz MA, Kyle RA. Amyloidosis with IgM monoclonal gammopathies. *Semin Oncol*. 2003;30(2):325-8.
71. Nobile-Orazio E. IgM paraproteinaemic neuropathies. *Curr Opin Neurol*. 2004;17(5):599-605.
72. Castillo JJ, Garcia-Sanz R, Hatjiharissi E, Kyle RA, Leleu X, McMaster M, et al. Recommendations for the diagnosis and initial evaluation of patients with Waldenström Macroglobulinaemia: A Task Force from the 8th International Workshop on Waldenström Macroglobulinaemia. *Br J Haematol*. 2016;175(1):77-86.
73. Gascue A, Merino J, Paiva B. Flow Cytometry. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018;32(5):765-75.
74. Paiva B, Montes MC, García-Sanz R, Ocio EM, Alonso J, de las Heras N, et al. Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenström's clone in IgM-MGUS and Waldenström's Macroglobulinemia: new criteria for differential diagnosis and risk stratification. *Leukemia*. 2014;28(1):166-73.

75. Poulain S, Boyle EM, Roumier C, Demarquette H, Wemeau M, Geffroy S, et al. MYD88 L265P mutation contributes to the diagnosis of Bing Neel syndrome. *Br J Haematol.* 2014;167(4):506-13.
76. Gustine JN, Meid K, Hunter ZR, Xu L, Treon SP, Castillo JJ. MYD88 mutations can be used to identify malignant pleural effusions in Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2018;180(4):578-81.
77. Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood.* 2014;123(18):2791-6.
78. Ansell SM, Kyle RA, Reeder CB, Fonseca R, Mikhael JR, Morice WG, et al. Diagnosis and Management of Waldenström Macroglobulinemia: Mayo Stratification of Macroglobulinemia and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Guidelines. *Mayo Clin Proc.* sept 2010;85(9):824-33.
79. Leblond V, Kastiris E, Advani R, Ansell SM, Buske C, Castillo JJ, et al. Treatment recommendations from the Eighth International Workshop on Waldenstroms Macroglobulinemia. *Blood.* 2016;128(10):1321-8.
80. Morel P, Duhamel A, Gobbi P, Dimopoulos MA, Dhodapkar MV, McCoy J, et al. International prognostic scoring system for Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood.* 2009;113(18):4163-70.
81. Gertz MA. Waldenström macroglobulinemia: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2019;94(2):266-76.
82. Grunenberg A, Buske C. Monoclonal IgM Gammopathy and Waldenström's Macroglobulinemia. *Dtsch Aerzteblatt Online [Internet].* 2017 [cité 18 août 2019]; Disponible sur: <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2017.0745>
83. Paludo J, Ansell SM. Advances in the understanding of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *F1000Research.* 2017;6:2142.
84. Miguët L, Lennon S, Baseggio L, Traverse-Glehen A, Berger F, Perrusson N, et al. Cell-surface expression of the TLR homolog CD180 in circulating cells from splenic and nodal marginal zone lymphomas. *Leukemia.* 2013;27(8):1748-50.
85. Ocio EM, Hernandez JM, Mateo G, Sanchez ML, Gonzalez B, Vidriales B, et al. Immunophenotypic and cytogenetic comparison of Waldenstrom's macroglobulinemia with splenic marginal zone lymphoma. *Clin Lymphoma.* 2005;5(4):241-5.
86. Vijay A, Gertz MA. Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood.* 2007;109(12):5096-103.
87. Rizzo D, Chauzeix J, Trimoreau F, Woillard JB, Genevieve F, Bouvier A, et al. IgM peak independently predicts treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia and correlates with accumulation of adverse oncogenetic events. *Leukemia.* 19 juin 2014;29:337.
88. 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.* 2000;343(26):1910-6.

89. Xu L, Hunter ZR, Yang G, Cao Y, Liu X, Manning R, et al. Detection of MYD88 L265P in peripheral blood of patients with Waldenström's Macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia*. 2014;28(8):1698-704.
90. Palladini G, Russo P, Bosoni T, Sarais G, Lavatelli F, Foli A, et al. AL Amyloidosis Associated with IgM Monoclonal Protein: A Distinct Clinical Entity. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009;9(1):80-3.
91. Chakraborty R, Novak AJ, Ansell SM, Muchtar E, Kapoor P, Hayman SR, et al. First report of MYD88 L265P somatic mutation in IgM-associated light-chain amyloidosis. *Blood*. 2016;127(23):2936-8.
92. Banwait R, Aljawai Y, Cappuccio J, McDiarmid S, Morgan EA, Leblebjian H, et al. Extramedullary Waldenström macroglobulinemia: Extramedullary Waldenström Macroglobulinemia. *Am J Hematol*. 2015;90(2):100-4.
93. Lin, MD P, Lai, MD, PhD R, Medeiros, MD LJ, Hao, MD S, Bueso-Ramos, MD, PhD C, Mansoor, MD A. Diffuse Large B-Cell Lymphoma Occurring in Patients With Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldenström Macroglobulinemia: Clinicopathologic Features of 12 Cases. *Am J Clin Pathol*. 2003;120(2):246-53.
94. Leleu X, Soumerai J, Roccaro A, Hatjiharissi E, Hunter ZR, Manning R, et al. Increased Incidence of Transformation and Myelodysplasia/Acute Leukemia in Patients With Waldenström Macroglobulinemia Treated With Nucleoside Analogs. *J Clin Oncol*. 2009;27(2):250-5.
95. Dimopoulos MA, Gertz MA, Kastiris E, Garcia-Sanz R, Kimby EK, LeBlond V, et al. Update on Treatment Recommendations From the Fourth International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *J Clin Oncol*. 2009;27(1):120-6.
96. Kyle RA, Treon SP, Alexanian R, Barlogie B, Björkholm M, Dhodapkar M, et al. Prognostic markers and criteria to initiate therapy in Waldenström's macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003;30(2):116-20.
97. Treon SP. How I treat Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2015;126(6):721-32.
98. Treon SP, Emmanouilides C, Kimby E, Kelliher A, Preffer F, Branagan AR, et al. Extended rituximab therapy in Waldenström's macroglobulinemia. *Ann Oncol*. 2005;16(1):132-8.
99. Castillo JJ, Kanan S, Meid K, Manning R, Hunter ZR, Treon SP. Rituximab intolerance in patients with Waldenström macroglobulinemia. *Br J Haematol*. 2016;174(4):645-8.
100. Kyle RA, Greipp PR, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, et al. Waldenström's macroglobulinemia: a prospective study comparing daily with intermittent oral chlorambucil. *Br J Haematol*. 2000;108(4):737-42.
101. Buske C, Leblond V. How to manage Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia*. 2013;27(4):762-72.
102. Dimopoulos MA, Garcia-Sanz R, Gavriatopoulou M, Morel P, Kyrtsolis M-C, Michalis E, et al. Primary therapy of Waldenström macroglobulinemia (WM) with weekly bortezomib, low-dose dexamethasone, and rituximab (BDR): long-term results of a phase 2 study of the European Myeloma Network (EMN). *Blood*. 2013;122(19):3276-82.

103. Treon SP, Tripsas CK, Meid K, Kanan S, Sheehy P, Chuma S, et al. Carfilzomib, rituximab, and dexamethasone (CaRD) treatment offers a neuropathy-sparing approach for treating Waldenstrom's macroglobulinemia. *Blood*. 2014;124(4):503-10.
104. Gertz MA, Anagnostopoulos A, Anderson K, Branagan AR, Coleman M, Frankel SR, et al. Treatment recommendations in Waldenstrom's macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003;30(2):121-6.
105. Treon SP, Tripsas CK, Meid K, Warren D, Varma G, Green R, et al. Ibrutinib in Previously Treated Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2015;372(15):1430-40.
106. Hunter Z, Liu X, Xu L, Yang G, Tripsas CK, Manning R, et al. Somatic Activating Mutations In CXCR4 Are Common In Patients With Waldenstrom's Macroglobulinemia, and Their Expression In WM Cells Promotes Resistance To Ibrutinib. Cao Y, éditeur. *Blood*. 2013;122(21):4424.
107. Owen RG, Kyle RA, Stone MJ, Rawstron AC, Leblond V, Merlini G, et al. Response assessment in Waldenström macroglobulinaemia: update from the VIth International Workshop. *Br J Haematol*. 2013;160(2):171-6.
108. Leblond V, Tournilhac O, Morel P. Waldenström's macroglobulinemia: prognostic factors and recent therapeutic advances. *Clin Exp Med*. 2004;3(4):187-98.
109. Kyle RA, Benson JT, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, et al. Progression in smoldering Waldenstrom macroglobulinemia: long-term results. *Blood*. 2012;119(19):4462-6.
110. Kastiris E, Kyrtonis M-C, Hadjiharissi E, Symeonidis A, Michalis E, Repoussis P, et al. Validation of the International Prognostic Scoring System (IPSS) for Waldenstrom's macroglobulinemia (WM) and the importance of serum lactate dehydrogenase (LDH). *Leuk Res*. 2010;34(10):1340-3.
111. Itzykson R, Le Garff-Tavernier M, Katsahian S, Diemert M-C, Musset L, Leblond V. Serum-free light chain elevation is associated with a shorter time to treatment in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Haematologica*. 2008;93(5):793-4.
112. Leleu X, Moreau A-S, Weller E, Roccaro AM, Coiteux V, Manning R, et al. Serum immunoglobulin free light chain correlates with tumor burden markers in Waldenstrom macroglobulinemia. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(6):1104-7.
113. Frébet E, Abraham J, Geneviève F, Lepelley P, Daliphard S, Bardet V, et al. A GEIL flow cytometry consensus proposal for quantification of plasma cells: Application to differential diagnosis between MGUS and myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011;80B(3):176-85.
114. Tedeschi A, Conticello C, Rizzi R, Benevolo G, Laurenti L, Petrucci MT, et al. Diagnostic framing of IgM monoclonal gammopathy: Focus on Waldenström macroglobulinemia. *Hematol Oncol*. 2019;37(2):117-28.
115. Séquenceur MiSeq Illumina® [Internet]. Disponible sur: <http://www.biofidal-lab.fr/details-sequencage+haut+debit+ngs+presentation+de+la+plateforme+de+sequencage+ngs-37.html>

116. Edgar RC, Flyvbjerg H. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics*. 2015;31(21):3476-82.
117. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60.
118. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res*. 2012;22(3):568-76.
119. McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* [Internet]. 2016 [cité 28 août 2019];17(1). Disponible sur: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-016-0974-4>
120. Yates A, Beal K, Keenan S, McLaren W, Pignatelli M, Ritchie GRS, et al. The Ensembl REST API: Ensembl Data for Any Language. *Bioinformatics*. 2015;31(1):143-5.
121. Yu X, Li W, Deng Q, Li L, Hsi ED, Young KH, et al. MYD88 L265P Mutation in Lymphoid Malignancies. *Cancer Res*. 2018;78(10):2457-62.
122. Yun S, Johnson AC, Okolo ON, Arnold SJ, McBride A, Zhang L, et al. Waldenström Macroglobulinemia: Review of Pathogenesis and Management. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017;17(5):252-62.
123. Paiva B, Corchete LA, Vidriales M-B, Garcia-Sanz R, Perez JJ, Aires-Mejia I, et al. The cellular origin and malignant transformation of Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 2015;125(15):2370-80.
124. Dimopoulos MA, Trotman J, Tedeschi A, Matous JV, Macdonald D, Tam C, et al. Ibrutinib for patients with rituximab-refractory Waldenström's macroglobulinaemia : an open-label substudy of an international, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(2):241-50.
125. Roubinet F, Cassar G, Gleizes B. Principes de la cytométrie en flux [Internet]. INRA Editions; 1989. Disponible sur: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00901869/document>
126. Principe d'un cytomètre en flux [Internet]. Disponible sur: <http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/Cours.html#mozTocId404630>
127. Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1990;48(8):579-82.
128. Principe de la PCR [Internet]. Disponible sur: <https://www.gnis-pedagogie.org/photos/biotech-12---amplification-adn.jpg>
129. Vassias I. Principe de l'amplification en chaîne par polymérase. *EMC - Biol Médicale*. 2012;7(1):1-5.
130. La méthode Sanger [Internet]. Disponible sur: https://esr.cscmonavenir.ca/files/2010/12/Method-Sanger-FR_7-7.pdf
131. Séquençage Haut Débit, outil incontournable de biologie moléculaire [Internet]. Disponible sur: <http://www.canceropole-gso.org>

132. Technologie de séquençage Illumina [Internet]. Disponible sur:
<https://emea.illumina.com/>

Annexes

Annexe 1. Grille de relecture cytologique.....	112
Annexe 2. Principe de la technique de cytométrie en flux	113
Annexe 3. Script R® de retraitement des données Kaluza®.....	115
Annexe 4. Principe de la PCR et de la PCR spécifique d'allèle	117
Annexe 5. Principe de la méthode Sanger	119
Annexe 6. Principe du séquençage haut débit ou séquençage de nouvelle génération et technologie Illumina®.....	120
Annexe 7. <i>Heatmap</i> représentant l'ensemble des résultats biologiques.....	123

Annexe 1. Grille de relecture cytologique

REVUE CYTOLOGIE MEDULLAIRE

NOM / Prénom : _____ Relecteurs : _____ Date relecture : __/__/__
 DDN : _____ N°GLIMS : _____ N°lames : _____ Date prélèvement : __/__/__

Qualité prélèv. / étal.	<input type="checkbox"/> RAS <input type="checkbox"/> Coagul. <input type="checkbox"/> Hémodil. <input type="checkbox"/> Mauvais étal.		
Décompte	Sur : _____ cellules		
Richesse	<input type="checkbox"/> Norm. <input type="checkbox"/> Augment. <input type="checkbox"/> Dim.		
Lignée Méga.	<input type="checkbox"/> Prés. <input type="checkbox"/> Abs. <input type="checkbox"/> Rares <input type="checkbox"/> Nomb.		<input type="checkbox"/> DysM
Lignée Granul.	<input type="checkbox"/> Prés. <input type="checkbox"/> Abs.		<input type="checkbox"/> DysG
Lignée Erythro.	<input type="checkbox"/> Prés. <input type="checkbox"/> Abs.		<input type="checkbox"/> DysE
Blastes	<input type="checkbox"/> >5%	Si dysmyélop., alors préciser :	
Autres commentaires	(Eo, cryo.,)		
Lymphocytes	___, ___ %	Corps Dutcher :	<input type="checkbox"/> 0 ou 1 <input type="checkbox"/> 2 ou +
Lympho-plasmocytes	___, ___ %	Cellules Mott :	<input type="checkbox"/> 0 ou 1 <input type="checkbox"/> 2 ou +
Plasmocytes	___, ___ %	Corps de Russel :	<input type="checkbox"/> 0 ou 1 <input type="checkbox"/> 2 ou +
	Si oui, préciser :		
	<input type="checkbox"/> Anomalie/taille		
	<input type="checkbox"/> Anomalies/cytoplasme		
	<input type="checkbox"/> Anomalies/noyau		
	<input type="checkbox"/> Autres		
Mastocytes	<input type="checkbox"/> Abs. <input type="checkbox"/> Rares/ Qq. <input type="checkbox"/> Nbr. <input type="checkbox"/> Anomalies. Si oui, préciser :		
OMS 2017 critères non cyto.	IgM	___, ___ g/L	Sd tumoral, hyperviscosité, anémie, autres atteintes d'organe en rapport avec la prolifération sous jacente <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> NR
	MYD88	<input type="checkbox"/> Non muté <input type="checkbox"/> Muté :	
Conclusion	<input type="checkbox"/> Compatible MW <input type="checkbox"/> Compatible sMW <input type="checkbox"/> Compatible M-MGUS <input type="checkbox"/> Aspect non diagnostique <input type="checkbox"/> Autres LNH/situations (ADICAP)		

Annexe 2. Principe de la technique de cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) permet l'analyse simultanée multiparamétrique et individuelle de particules en suspension dans un liquide (cellules, bactéries, parasites ou billes par exemple). Outre la taille et la granulosité intracellulaire, les particules peuvent être marquées par différents anticorps monoclonaux couplés à des fluorophores, voire rendues fluorescentes directement par certaines molécules chimiques (marquage de l'ADN par exemple). En oncohématologie, la suspension cellulaire est réalisée à partir de prélèvements divers tels que le sang, la moelle osseuse, les ganglions, ... Dans le cytomètre, la suspension cellulaire est concentrée en un flux de liquide de sorte que chaque cellule passe l'une après l'autre devant les lasers (excitation des fluorochromes) et les système optiques de détection (lecture du niveaux de fluorescence) (125) (Figure 61). La cellule passe ensuite devant le système optique composé d'un ou plusieurs faisceaux lasers. Chaque cellule va émettre des signaux lumineux qui seront séparés par des filtres optiques.

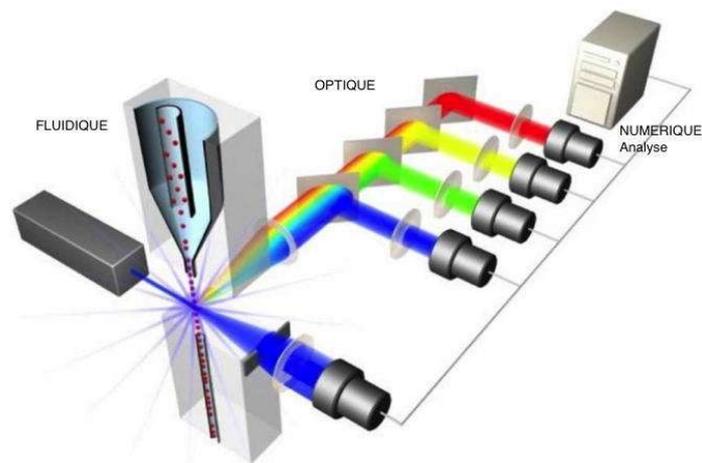


Figure 61 : Principe d'un cytomètre en flux (126)

Ces derniers dirigent la lumière émise vers des photomultiplicateurs puis des détecteurs qui captent :

- La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) renseigne sur la taille des cellules
- La lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter, SSC) renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des cellules
- Les signaux de fluorescence : émis par la cellule elle-même (autofluorescence) ou par un anticorps couplé à un fluorochrome et qui se lie spécifiquement à la cellule.

La vitesse d'acquisition des données est très importante, de l'ordre de milliers de cellules par seconde. Après traitement numérique, les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes monoparamétriques ou biparamétriques auxquels s'ajoutent des statistiques concernant les populations cellulaires et les paramètres étudiés (pourcentage, coefficient de variation, intensité de fluorescence, ...). Les cellules sont visualisées sous forme de

représentations électroniques, appelées événements, en fonction des signaux relatifs à leur forme, structure et fluorescence (Figure 62).

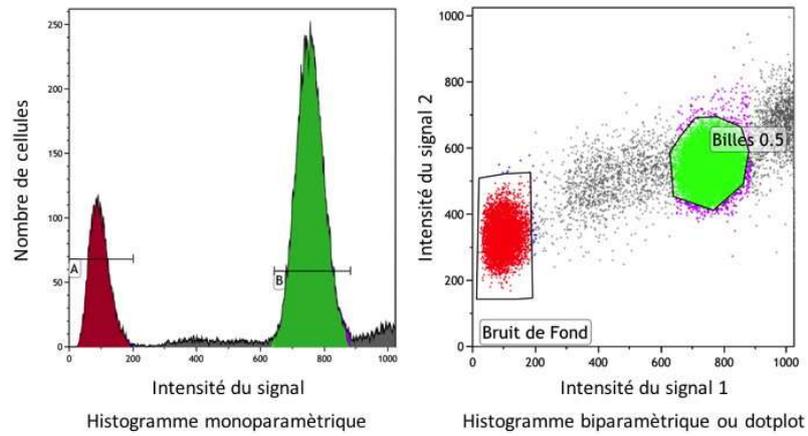


Figure 62 : Présentation des résultats de cytométrie en flux

Annexe 3. Script R® de retraitement des données Kaluza®

```
RStudio
File Edit Code View Plots Session Build Debug Profile Tools Help
Go to file/function Addins
Script_extraction_Kaluza utilisé 17032... x
Source on Save Run Source
1 # script de récupération de données extraites depuis KALUZA
2
3
4 # sélection d'un espace de travail
5
6
7 ##### ETAPE 1 #####
8
9 # créer sur Excel un table avec le "chemin" des données utiles à extraire
10 # "chemin" façon Kaluza, avec colonnes comme suit :
11 # --> nom_de_la_variable / Input Gate / X Parameter / Y Parameter / Gate / nom_de_la_metrrique souhaitée, ex. "%total"
12
13 # charger ce fichier sous le nom générique de "chemin"
14 chemin <- read.delim(file = "table_chemin_plasmo_lympho.txt", sep = "\t", header = TRUE, stringsAsFactors = FALSE)
15
16 # éliminer les espace dans "chemin"
17 # pour cela, créer une fonction "supprespace" puis l'appliquer à toutes les valeurs de "data_kaluza"
18
19 supprespace=function(string){
20   a<-unlist(strsplit(string, " "))
21   a<-ifelse(all(a!=""),paste(a,collapse="."),paste(a[-which(a=="")],collapse="."))
22   a
23 }
24
25 # appliquer la fonction supprespace au tableau "chemin"
26
27 for (i in 1:nrow(chemin)){
28   for (j in 1:ncol(chemin)){
29     k <- unlist(chemin[i,j])
30     if (is.character(k)){chemin[i,j] <- supprespace(k)}
31   }
32 }
33
34
35 ##### ETAPE 2 #####
36
37 # générer la liste des fichiers à analyser qui doivent être regroupés dans un dossier "input_kaluza"
38 files_to_parse <- dir("input_from_kaluza")
39
40 # lecture du fichier le plus complet pour récupérer tous les noms des échantillons
41 data_kaluza <- read_excel(path = paste0("input_from_kaluza/",files_to_parse[4]))
42
43 # remplacer tous les espaces de la table de données par un point "." pour mimer la lecture de R et
44 # éviter les "stop" pour cause d'erreur de lecture.
45 for (i in 1:nrow(data_kaluza)){
46   for (j in 1:ncol(data_kaluza)){
47     k <- unlist(data_kaluza[i,j])
48     if (is.character(k)){data_kaluza[i,j] <- supprespace(k)}
49   }
50 }
51
52 # ne conserver que le nom :
53 data_kaluza$nom <- sub(pattern = "(KAPPA-LAMB|38F_138PE_|FMC7_10_19|K_L_4_19_2)\\.([[:alpha:]]*)\\.\\.\\.\"", "\\2", x = data_kaluz
54
55 # ne conserver que la première lettre du prénom :
56 data_kaluza$lettre_prenom <- sub(pattern = "(KAPPA-LAMB|38F_138PE_|FMC7_10_19|K_L_4_19_2)\\.([[:alpha:]]*)\\.([[:alpha:]]{1})",
57
58 # agréger nom et première lettre du prénom
59 data_kaluza$name <- paste0(data_kaluza$nom, data_kaluza$lettre_prenom)
60
61 # récupérer la liste des noms d'échantillons dans l'objet "name_vector"
62 name_vector <- unique(data_kaluza$name)
63
64
65 ##### ETAPE 3 #####
66
67 # créer un dataframe (tableau) vide avec 1 ligne par échantillon et 1 colonne par variable à récupérer, sous le
```

```

68 # nom générique de "data_ready"
69 data_ready <- matrix(nrow = length(name_vector), ncol = nrow(chemin) + 1)
70 colnames(data_ready) <- c("Data_Set", as.vector(chemin$variable))
71 data_ready <- as.data.frame(data_ready)
72 data_ready$Data_Set <- name_vector
73
74
75
76 ##### ETAPE 4 #####
77
78 # remplir de tableau "data_ready" avec les données du "data_kaluza" selon les chemins de la table "chemin"
79 #
80 # on utilise une boucle pour chaque ligne de "data_ready" qu'il faut remplir et une boucle sur la colonne également
81 #
82 # on fait un boucle pour gérer tous les fichiers de kaluza rangés dans le dossier "input_from_kaluza"
83
84
85 for (file_number in 1:length(files_to_parse)){
86
87   # lecture du fichier le plus complet pour récupérer tous les noms des échantillons
88   data_kaluza <- read_excel(path = paste0("input_from_kaluza/",files_to_parse[file_number]))
89
90   # remplacer tous les espaces de la table de données par un point "." pour mimer la lecture de R et
91   # éviter les "stop" pour cause d'erreur de lecture.
92   for (i in 1:nrow(data_kaluza)){
93     for (j in 1:ncol(data_kaluza)){
94       k <- unlist(data_kaluza[i,j])
95       if (is.character(k)){data_kaluza[i,j] <- suppressspace(k)}
96     }
97   }
98
99   # ne conserver que le nom :
100   data_kaluza$nom <- sub(pattern = "(KAPPA-LAMB|38F_138PE_|FMC7_10_19|K_L_4_19_2)\\.([[:alpha:]]*)\\.\\.*", "\\2", x = data_kal
101
102   # ne conserver que la première lettre du prénom :
103   data_kaluza$lettre_prenom <- sub(pattern = "(KAPPA-LAMB|38F_138PE_|FMC7_10_19|K_L_4_19_2)\\.([[:alpha:]]*)\\.([[:alpha:]]{1
104
105   # agréger nom et première lettre du prénom
106   data_kaluza$name <- paste0(data_kaluza$nom, data_kaluza$lettre_prenom)
107
108   # lancer la boucle
109   for (i in 1:nrow(data_ready)){
110     for (j in 1:length(chemin$variable)){
111
112       # il faut une condition "is.na" pour vérifier que le chemin existe bien (cas des fenêtres avec noms différents qui
113       # ne permettent pas d'aller chercher la valeur cible)
114       k <- as.numeric(data_kaluza[data_kaluza$name == data_ready$Data_Set[i]
115         & data_kaluza$`Input Gate` == paste0("[" ,chemin[j,"Input.Gate"],"]")
116         & data_kaluza$`X Parameter` == chemin[j,"X.Parameter"]
117         & data_kaluza$`Y Parameter` == chemin[j,"Y.Parameter"]
118         & data_kaluza$gate == chemin[j,"Gate"]
119         ,chemin[j,"Metrics"]
120       ])
121
122       if (is.na(k) == FALSE){data_ready[i,chemin[j,"variable"]] <- k}
123     }
124   }
125 }
126 }
127 }
128
129
130
131 ##### ETAPE 5 #####
132
133 # enregistrer la table "data_ready" avec le nom souhaité :
134
135 nom_de_la_table <- "data_kaluza_17mars2019"
136 write.table(file = paste0(nom_de_la_table, ".txt"), x = data_ready, sep = "\t", quote = FALSE, row.names = FALSE)
137

```

Annexe 4. Principe de la PCR et de la PCR spécifique d'allèle

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne a été inventée par le scientifique américain Kary Bank Mullis en 1983 ce qui lui valut le prix Nobel de chimie en 1993 (127). Cette technique permet l'amplification in-vitro de plusieurs millions de copies d'une séquence spécifique d'acides nucléiques présente en faible quantité dans l'échantillon.

Il s'agit d'un processus de réplication basé sur la capacité d'une enzyme, l'ADN polymérase, à synthétiser le brin complémentaire d'un brin d'ADN servant de matrice. Ce processus est constitué d'une succession de réactions de réplication, appelées cycles. Chaque réaction nécessite deux amorces oligonucléotidiques ou *primers* qui s'hybrident de part et d'autre de la séquence à amplifier. Ces amorces doivent être complémentaires des brins d'ADN d'intérêt et permettre à l'ADN polymérase de répliquer les 2 monobrins dans le sens 5' vers 3'. Un mélange, appelé « mix de PCR » contient tous les éléments indispensables au bon déroulement de la réaction, il contient :

- Les séquences d'ADN à amplifier
- Les amorces qui bornent le segment d'ADN d'intérêt
- L'enzyme polymérase thermostable
- Le MgCl₂, cofacteur de la polymérase
- Les 4 déoxyribonucléotides (dNTP) constitutifs de l'ADN : dCTP (désoxycytidine triphosphate, dGTP (désoxyguanosine triphosphate), dATP (désoxyadénosine triphosphate) et dTTP (désoxythymidine triphosphate)
- Le tampon de réaction
- De l'eau dépourvue de DNase pour compléter le volume de réaction

La réaction de PCR est réalisée dans un bloc thermique ou thermocycleur dans lequel sont placés les microtubes contenant le mix. Cet automate permet de générer différents cycles thermiques programmables dans une enceinte close.

Chaque cycle de PCR est composé de trois étapes (Figure 63) :

- La dénaturation : généralement effectuée à 95°C, elle permet de rompre les faibles liaisons hydrogènes de la double hélice et de générer deux simples brins d'ADN.
- L'hybridation : elle consiste en l'appariement des amorces à la séquence d'ADN complémentaire. La température est inférieure à celle de la dénaturation et dépend des amorces choisies (habituellement comprise entre 50°C et 65°C).
- L'élongation : elle correspond à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire par incorporation des déoxyribonucléotides par la polymérase (Taq) à partir du brin matrice. Cette étape s'effectue à une température de 72°C le plus souvent, mais dépend de la polymérase utilisée.

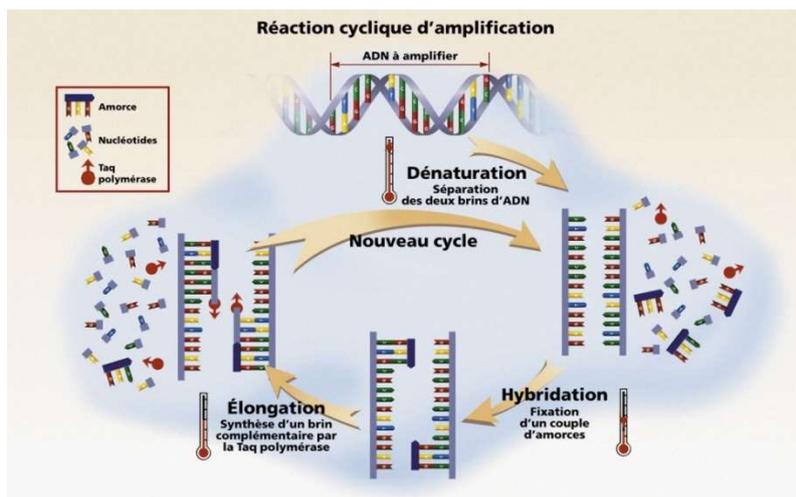


Figure 63 : Principe de la PCR (128)

A chaque cycle de PCR, le brin d'ADN nouvellement formé sert à son tour de matrice pour le cycle suivant. En pratique, le nombre de cycle est limité par l'activité de l'ADN polymérase qui tend à diminuer au fil des réactions et par la quantité de réactifs. A l'issue de la réaction de PCR, on obtient des fragments d'ADN de même taille qui correspondent à la séquence d'intérêt amplifiée.

La PCR spécifique d'allèle ou AS-PCR est basée sur le principe de non-appariement d'une amorce en 3' qui empêche l'amplification du fragment. Cette technique nécessite un minimum de deux réactions par échantillon d'ADN. Chaque réaction contient une amorce spécifique du gène qui est commune aux deux allèles, et une amorce spécifique de la séquence normale ou mutée de l'allèle (Figure 64). Si la séquence complémentaire (mutée ou non mutée) de l'amorce spécifique n'est pas présente, l'amorce ne s'hybride pas sur l'ADN et aucune amplification n'est possible. Les résultats des deux réactions sont visualisés par migration électrophorétique. La présence d'une amplification pour un couple d'amorce donné signe la présence de l'allèle correspondant sur le gène, et inversement. Il est indispensable de réaliser un contrôle positif afin de s'assurer qu'une absence d'amplification provient bien de l'absence de l'allèle et non d'un problème dans la réaction (129).

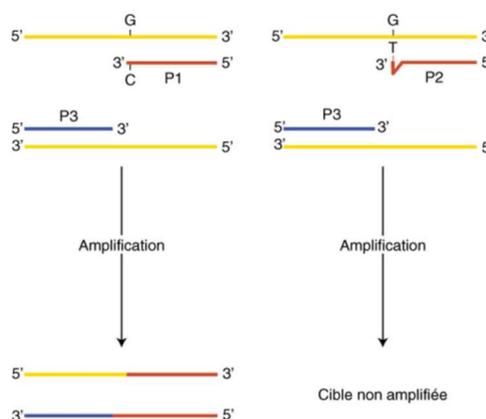


Figure 64 : Principe de la PCR spécifique d'allèle (129)

Annexe 5. Principe de la méthode Sanger

Le séquençage de l'ADN correspond à l'identification des nucléotides successifs qui le composent. La méthode Sanger, du nom de son inventeur Frédérick Sanger, double prix Nobel de chimie (en 1958 et 1980) ou « technique de terminaison de chaîne » constitue la méthode de référence utilisée dans les laboratoires.

Le principe de cette technique est de générer de nombreuses molécules d'ADN simple brin complémentaires à l'ADN d'intérêt, de tailles différentes mais commençant toutes à l'extrémité 5'. Il s'agit d'une réaction de PCR avec une amorce unique qui permet à l'ADN polymérase d'incorporer les nucléotides et de synthétiser le brin complémentaire. La fin de l'élongation est provoquée par l'intégration dans le fragment en cours de synthèse d'un didésoxyribonucléotide ou ddNTP, nucléotide dépourvu du groupement hydroxyle en position 3'. Ce ddNTP, également appelé terminateur de chaîne, empêche l'incorporation du nucléotide suivant. La phase d'élongation se déroule dans un milieu réactionnel où dNTP et ddNTP sont présents, la terminaison a donc lieu de façon aléatoire dans les fragments d'ADN en synthèse. Dans la méthode originale de Sanger, quatre réactions de séquençage sont effectuées, chacune comprenant un ddNTP différent (ddATP, ddTTP, ddCTP et ddGTP). Les produits des différentes réactions sont ensuite séparés par une technique de migration électrophorétique selon leur poids moléculaire. L'identification du ddNTP marqué par un fluorochrome présent à l'extrémité 3' de chaque fragment permet de reconstituer la séquence nucléotidique du brin matrice initial (Figure 65). Le développement des marquages fluorescents et de l'électrophorèse capillaire a permis l'automatisation de cette méthode.

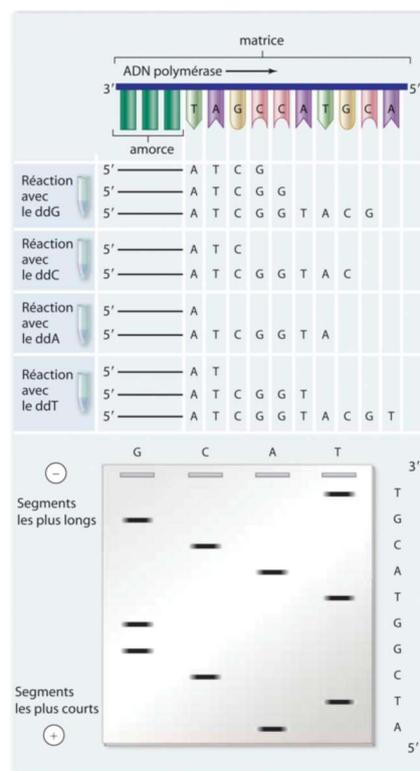


Figure 65 : Principe de la méthode de séquençage Sanger (130)

Annexe 6. Principe du séquençage haut débit ou séquençage de nouvelle génération et technologie Illumina®

Le séquençage de nouvelle génération ou NGS (*Next Generation Sequencing*) est une technologie de séquençage à haut débit qui permet de séquencer l'ADN ou l'ARN de plusieurs échantillons simultanément. Cette technologie supplante la méthode Sanger par sa rapidité d'exécution, les possibilités de multiplexage des réactions qu'elle offre et son coût qui la rend plus accessible aujourd'hui. Différentes technologies de NGS co-existent actuellement dont deux principales : Ion Torrent et Illumina ; elles sont basées sur le même principe (Figure 66) :

- La préparation de bibliothèques : les bibliothèques sont des fragments de l'ADN d'intérêt obtenu par fragmentation ou amplification, de taille homogène et marqués par de courtes séquences. Ces séquences servent à l'identification de l'échantillon notamment et selon la technologie, la fixation sur un support solide, l'initialisation de la réaction de séquençage, etc.
- L'amplification des bibliothèques grâce à des méthodes d'amplification clonale et de PCR
- Le séquençage, différent selon la technologie utilisée
- L'analyse bio-informatique des données brutes

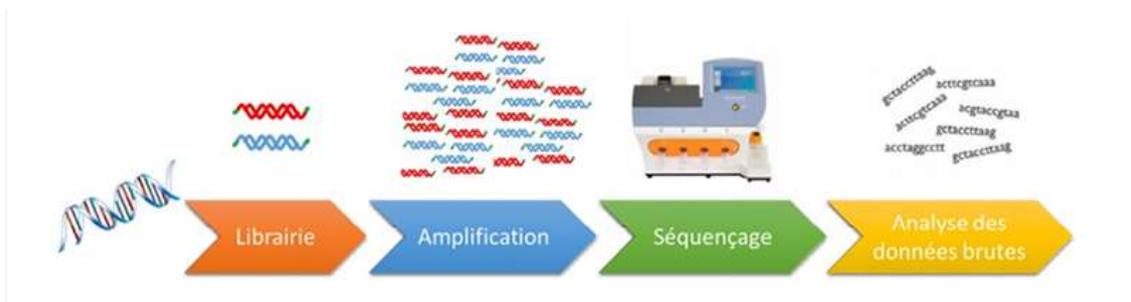


Figure 66 : Séquençage Haut Débit, outil incontournable de biologie moléculaire (131)

La technologie Illumina® repose sur la « bridge amplification » ou amplification en pont des fragments à séquencer. Les réactions ont lieu en phase solide sur une lame en verre appelée flow cell. Le principe de la méthode est basé sur l'incorporation de déoxynucléotides bloqués en 3' et marqués par fluorescence (une couleur de fluorescence pour chaque base A, T, C et G) (Figure 67).

Les bibliothèques sont constituées d'ADN double brin à l'extrémité desquels ont été ajoutés des adaptateurs spécifiques. Ces adaptateurs vont permettre l'adhésion des fragments d'ADN à la flow cell. L'ADN, préalablement dénaturé en fragments simples brins, va se fixer de façon aléatoire et covalente à la flow cell. Le brin complémentaire est synthétisé par une polymérase, puis le brin d'origine est éliminé par dénaturation. L'extrémité libre du brin restant s'hybride à un adaptateur adjacent présent sur la flow cell et forme un pont. L'ADN polymérase synthétise à nouveau le brin complémentaire pour former un pont d'ADN double brin, les deux copies sont ensuite libérées par dénaturation. Cette étape d'amplification est répétée un très grand

nombre de fois pour former un cluster où sont regroupés tous les brins complémentaires nouvellement synthétisés. S'ensuit une étape de linéarisation où tous les brins antisens sont clivés. L'extrémité 3' des fragments d'ADN est libre et le séquençage débute après hybridation de l'amorce de séquençage. Il s'effectue simultanément sur des centaines de millions de cluster grâce à une chimie de terminateurs réversibles. Des nucléotides terminateurs de chaîne réversibles marqués par des fluorophores différents sont ajoutés et excités par l'ADN polymérase. Le signal émis est spécifique du fluorophore et permet l'identification du nucléotide qui le porte. Les nucléotides marqués sont ensuite clivés permettant l'ajout du nucléotide suivant. Le séquençage s'effectue base par base jusqu'à la fin du fragment, le principal risque inhérent à la méthode étant l'erreur de substitution d'une base par une autre.

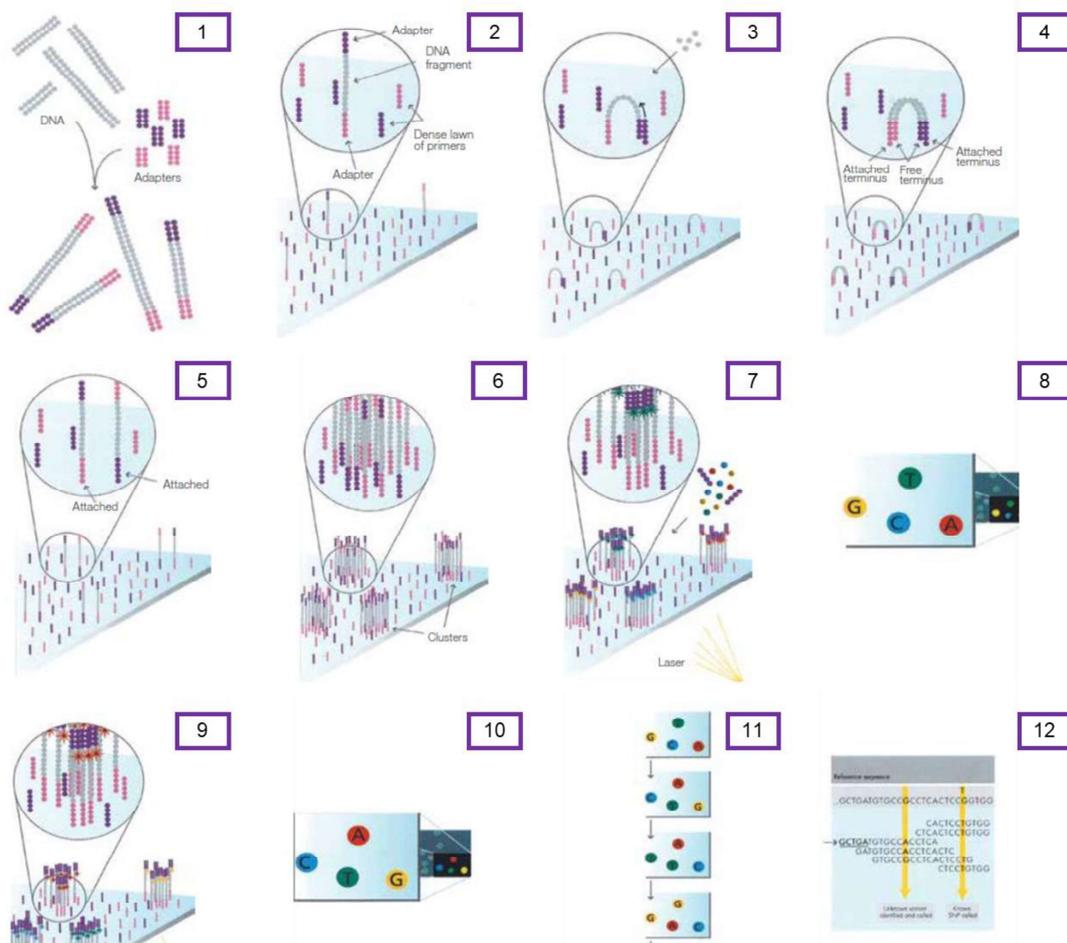


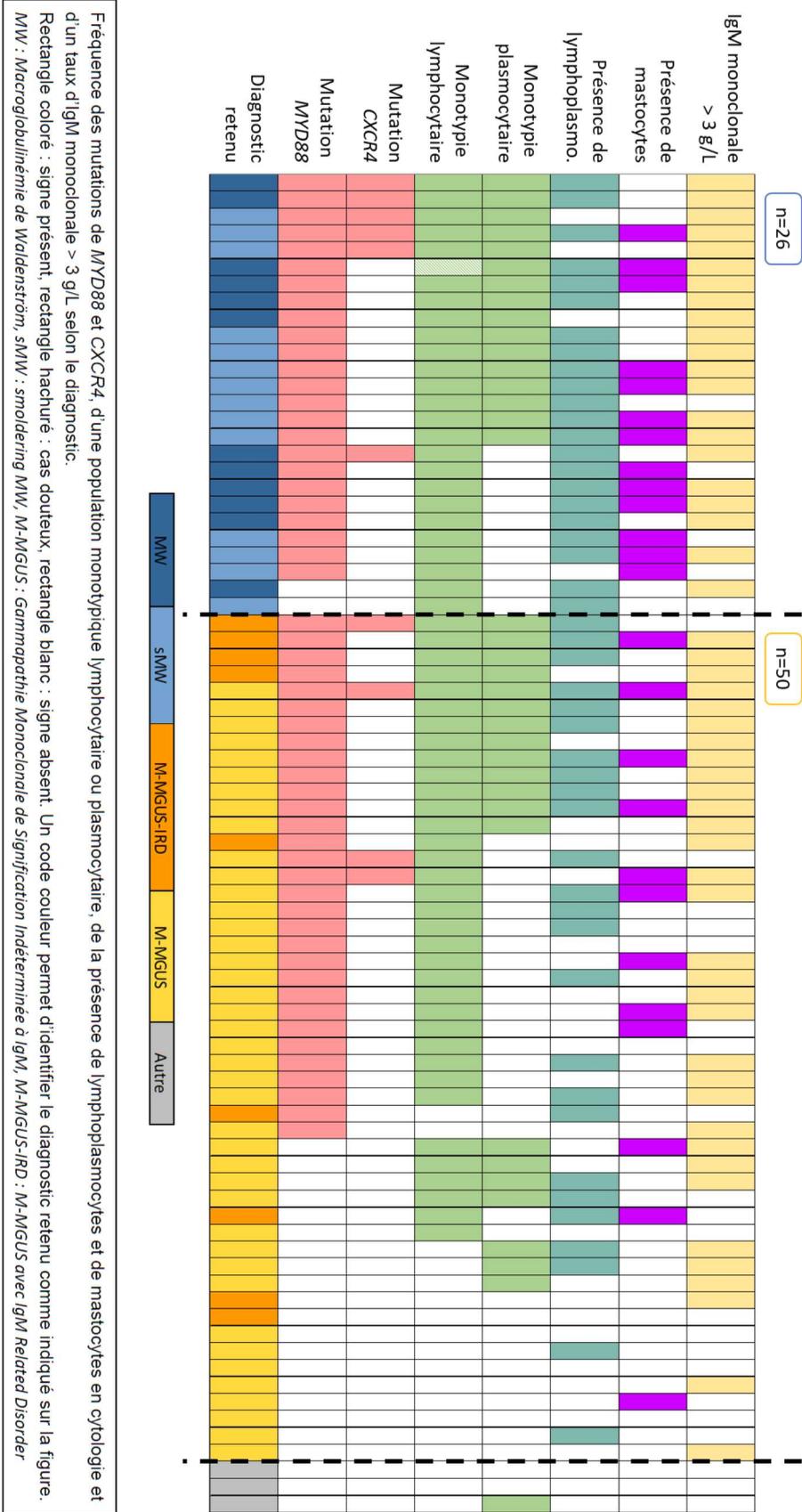
Figure 67 : Principe de la technologie Illumina® (132)

1 : préparation de la banque d'ADN à partir de l'échantillon : génération aléatoire de fragments d'ADN génomique double brin et liaison d'adaptateurs spécifiques aux deux extrémités. S'ensuit une étape de dénaturation en ADN simple brin ; 2 : adhésion aléatoire des fragments simple brin de l'ADN à la surface de la flow cell ; 3 : amplification en pont : ajout des nucléotides et des enzymes non marqués qui initient l'amplification en phase solide ; 4 : élongation : l'enzyme incorpore des nucléotides ce qui conduit à la formation des « bridge » ou ponts double brin ; 5 : dénaturation du « bridge » et formation de deux fragments simple brin ; 6 : amplification : répétition du cycle d'amplification, plusieurs millions de clusters d'ADN double brin sont générés dans chaque canal de la flow cell ; 7 : identification de la première base : le premier cycle de séquençage débute après l'ajout des quatre bases marquées, des amorces et de l'ADN polymérase ; 8 : première image : après excitation par le laser, la fluorescence émise par chaque

cluster est capturée et la première base est identifiée ; 9 : identification de la deuxième base : le cycle suivant est identique au premier avec ajout des quatre bases marquées, des amorces et de l'ADN polymérase ; 10 : deuxième image : après excitation par le laser, la fluorescence émise par chaque cluster est capturée et la deuxième base est identifiée ; 11 : répétition des cycles de séquençage afin de déterminer la séquence de l'ADN base par base ; 12 : alignement des données et comparaison à une base de données de référence

Les résultats sont récupérés sous forme de données brutes au format FASTQ qui contient la totalité des séquences obtenues ou FASTA (Fast Alignment) et des informations sur la qualité de chacune des bases de chacune des séquences du fichier (Q). Ces données doivent subir un traitement bio-informatique afin d'être analysées biologiquement par la suite. Différents logiciels, dont certains sont en accès libre en ligne, vont permettre l'alignement des séquences sur le génome de référence, on obtient alors un fichier BAM (Binary Alignment Map) au format binaire. Ce fichier révèle tous les défauts d'alignement parmi lesquels : des mutations, des polymorphismes, des erreurs de séquençage, etc. Il est donc nécessaire de réaliser une identification des variants via un logiciel appelé variant caller qui fournit un fichier texte tabulé ou VCF (Variant Call Format), de filtrer ces variants et de les annoter afin d'identifier les polymorphismes rares, les mutations délétères, etc. Ce fichier VCF annoté peut être transformé en fichier texte qui contient la liste des variants retenus et annotés.

Annexe 7. Heatmap représentant l'ensemble des résultats biologiques



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.

Macroglobulinémie de Waldenström : intérêt diagnostique du double immunophénotypage lymphocytaire et plasmocytaire et exploration du statut mutationnel des gènes MYD88 et CXCR4

La macroglobulinémie de Waldenström (MW) est un lymphome indolent classé parmi les lymphomes lymphoplasmocytaires associés à une IgM monoclonale sérique. La mutation de *MYD88* est retrouvée dans 80% à 90% des cas. En 2019, le diagnostic de MW reste délicat, en effet, d'autres lymphomes indolents peuvent associer une différenciation plasmocytaire variable et un pic IgM, de plus, la mutation de *MYD88* n'est pas absolument spécifique de la MW. Sur la base du *continuum* de différenciation lymphoplasmocytaire, caractéristique cardinale de la MW, nous avons fait l'hypothèse que la mise en évidence par cytométrie en flux (CMF) d'une double population lymphocytaire B et plasmocytaire monotypique dans la moelle osseuse pourrait contribuer au diagnostic de MW. Nous avons étudié une série de 79 patients explorés en CMF pour bilan de pic IgM entre 2012 et 2019. Les patients de notre cohorte ont été reclassés en 26 MW (12 formes symptomatiques et 14 formes indolentes), 50 M-MGUS dont 9 avaient une symptomatologie liée à l'IgM et 3 lymphomes de bas grade non LLC (1 LZM et 2 LNH-B). La présence de la double population (lymphocytes et plasmocytes) monotypique était fortement associée au statut *MYD88* muté et une mutation de *CXCR4* était détectée dans 25% des cas présentant ce triptyque diagnostique. Le phénotype des plasmocytes de MW était proche de celui des plasmocytes normaux et la présence de ce clone plasmocytaire était associée à un taux d'IgM monoclonale élevée. Au final, la présence en CMF d'une double population lymphocytaire B et plasmocytaire monotypique médullaire apparaît donc hautement prédictive et spécifique de la présence d'une mutation *MYD88* et du diagnostic de MW.

Mots-clés : Macroglobulinémie de Waldenström, différenciation lymphoplasmocytaire, immunophénotypage plasmocytaire, MYD88, CXCR4

Waldenström macroglobulinemia: diagnostical impact of both B-cells and plasma cells immunophenotype and exploration of *MYD88* and *CXCR4* genes mutations

Waldenström macroglobulinemia (WM) is an indolent lymphoma classified as lymphoplasmacytic lymphoma associated with serum monoclonal IgM. The mutation of *MYD88* is found in 80% to 90% of cases. In 2019, the diagnosis of WM remains difficult. Indeed, other indolent lymphomas can associate variable plasma cell differentiation and IgM peak, moreover, the mutation of *MYD88* is not absolutely specific to WM. Based on the lymphoplasmocyte *continuum* of differentiation, a cardinal feature of MW, we hypothesized that detection by flow cytometry (FCM) of a double monotypic population of B-cells and plasma cells in the bone marrow could contribute to the diagnosis of WM. We studied a series of 79 patients explored with FCM at the discovery of an IgM peak between 2012 and 2019. A diagnostic reclassification of the whole series finally retained 26 WM (12 symptomatic and 14 smoldering cases), 50 M-MGUS including 9 cases with IgM-related disorders, and 3 low-grade non-LLC lymphomas (1 MZL and 2 B-NHLs). The presence of the both monotypic B-cells and monotypic plasma cells was strongly associated with the mutated *MYD88* status and a *CXCR4* mutation was detected in 25% of these cases. The phenotype of monotypic WM plasma cells was close to that of normal counterpart and their presence was associated with a high level of monoclonal IgM. Finally, the presence in CMF of a both monotypic populations of B-cells and plasma cells in the bone marrow appears as highly predictive and specific for the presence of a *MYD88* mutation and for the diagnosis of WM.

Keywords : Waldenström Macroglobulinemia, lymphoplasmocyte differentiation, plasma cells immunophenotyping, MYD88, CXCR4

