

UNIVERSITE DE DROIT ET SANTE DE LILLE II

Ecole Doctorale Biologie-Santé

THESE DE DOCTORAT

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Discipline : Hématologie

Par

Stéphanie Poulain

CARACTERISATION GENOMIQUE DES MUTATIONS DU GENE *CXCR4* DANS LA MALADIE DE WALDENSTRÖM

Soutenue publiquement le 21 Septembre 2016 devant le jury composé de :

Professeur Xavier Leleu

Professeur Jean Pierre Marolleau

Professeur Fabrice Jardin

Professeur Marie Christine Copin

Professeur Gilles Salles

Professeur Claude Preudhomme

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

J'adresse tout d'abord mes sincères et respectueux remerciements aux membres du jury :

- Monsieur le Professeur **Xavier Leleu**, qui me fait l'honneur de présider cette thèse. Merci pour ta disponibilité en dépit des décalages horaires, ton enthousiasme parfois débordant, tes conseils pragmatiques qui ont tenté de me faire grandir et ton soutien (énergique) tout au long de ces années. De Lille à Poitiers, d'une idée à un papier : merci pour le plaisir d'avoir pu partager tous les projets passés et, surtout, à venir.
- Monsieur le Professeur **Fabrice Jardin** et Monsieur le Professeur **Jean Pierre Marolleau**, de me faire l'honneur d'être rapporteurs de ce travail avec autant de disponibilité et d'assiduité à la lecture du travail.
- Madame le Professeur **Marie Christine Copin** et Monsieur le Professeur **Gilles Salles** d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse avec beaucoup de spontanéité.
- Monsieur le Professeur **Claude Preudhomme** pour avoir accepté d'être le directeur de thèse et pour votre confiance au cours de ce projet. Je vous remercie particulièrement pour votre soutien dans l'évolution de mon parcours professionnel ces derniers mois.

Je tiens également à remercier :

- Christophe Roumier pour son aide sympathique dans les discussions des résultats et ses conseils pertinents.... autour de cannelés.
- Elisabeth Bertrand qui, à l'IRCL, a assuré avec disponibilité et bonne humeur le développement de la thématique « Waldenström »
- Monsieur le Professeur Bruno Quesnel, pour avoir accueilli nos projets dans l'Unité UMRS-1172.
- Sandrine Geffroy, Aurélie Caillault Venet, Shéhérazade Sebda, Martin Figeac et Frédéric Leprêtre pour leur aide déterminante dans ce travail ainsi que les techniciens de l'UF de Biologie Moléculaire du CH de Valenciennes et du CHU de Lille.
- L'ensemble de mes collègues biologistes des laboratoires d'Hématologie du CH de Valenciennes et du CHU de Lille pour leur sympathique soutien au cours de ce travail.
- Monsieur le Professeur Patrick Duthilleul et Fabienne Le Baron, qui savent à quel point cette soutenance est importante pour moi... après toutes ces années (*Fluctuat nec mergitur*).
- Sabine Tricot, Thomas Quemeneur, Philippe Gower et Stéphanie Vermoesen : « initier » l'Unité de Recherche Clinique du CH de Valenciennes restera un excellent souvenir.

Je remercie naturellement La Ligue Contre le Cancer et la FFRMG et tous ceux qui m'ont aidé, de près ou de loin, dans tous mes projets de recherches.

GLOSSAIRE

A

ABC : *Activated B-cell like*

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AHAI : Anémie hémolytique auto-immune

AKT: Protéine kinase B

ARN : Acide Ribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

B

BCR: *B cell receptor*

BOM: Biopsie ostéomédulaire

BTK: *Burton's tyrosine kinase*

C

CARD11: *Caspase recruitment domain-containing protein 11*

CCL: *C-C motif chemokine ligand*

CD: *cluster of differentiation* ou classe de différenciation

CDR : *Complementarity –determining region* ou région déterminant la complémentarité

CG : Centre germinatif

CGH : Hybridation génomique comparative

CMF : Cytométrie en flux

CMN: Cellules mononuclées

CNA: *Copy number alteration*

CNLOH: *Copy neutral loss of heterozygosity*

CXCL: *CXC-chemokine ligand*

CXCR4: *C-X-C chemokine recepteur type 4*

D

Del : délétion

DLBCL : Lymphome Diffus à grandes cellules

B ou *Diffuse large B cell lymphoma*

ddNTP: Didésoxyribonucléotide

dNTP: Désoxyribonucléotide 5'-triphosphate

DMSO: Diméthylsulfoxyde

E

ECD: Phycoerythrin-Texas red

ECL: *Extracellular loop*

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

Acétique

EPS : Electrophorèse des protéines sériques

ERK : *Extracellular signal-regulated kinases*

F

F: Fragment cristallisable

FDR: *False discovery rate*

FGFR: Fibroblast growth factor receptor

FITC: Fluorescein isothiocyanate

FISH: Hybridation *in situ* par fluorescence

FLC: *Free Light Chain*

G

GCB: *Germinal center like*

GEP: *Gene expression profiling*

GSEA: *Gene set expression analysis*

I

ICAM : *Intracellular adhesion molecule*

ICL : *Intracellular loop*

Ig: Immunoglobuline

IgVH : chaîne lourde des immunoglobulines

IGV: *Integrative genome viewer*

IκBα: *Inhibitor of kappa B alpha*

IKK: *inhibitor of NFκB kinase*

IFN: Interféron

IL: Interleukine

IPA: *Ingenuity pathway analysis*

IPSSWM: *International Prognostic Scoring System for Waldenström macroglobulinemia*

IRAK: *Interleukin-1 receptor-associated kinase*

J

JAK: *Janus Activated Kinase*

L

LOH: *Loss of heterozygosity*

LLC: *Leucémie lymphoïde chronique*

LLP: *Lymphome lymphoplasmocytaire*

M

MALT1: *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protéin 1*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MAPKK : *MAPK kinase*

MFIR: *Moyenne d'intensité de fluorescence relative*

MGUS: *Monoclonal gammopathy of undetermined significance*

MiARN: *MicroARN*

MO: *Moelle osseuse*

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

MUT: *Allèle muté*

MW: *Maladie de Waldenström*

MYD88: *Myeloid differentiation primary response gene 88*

MZL: *Marginal Zone Lymphoma ou Lymphome de la zone marginale*

N

NFAT: *Nuclear factor of activated T cells*

NFκB: *Nuclear factor-KB signaling pathway*

NGS: *Next generation sequencing ou séquençage à haut débit*

O

OMS : *Organisation mondiale de la santé*

P

Pb : *Paires de bases*

PBS : *Phosphate buffer saline*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PE : *Phycoérythrine*

PI3K: *Phosphatidylinositol 3 kinase*

PKB ou AKT: *Protéine kinase B*

PKCβ: *Protein kinase Cβ*.

S

SaS: *Séquençage Sanger*

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

SNP a: *Single Nucleotide Polymorphism arrays*

STAT: *Signal transducer and activator of transcription*

SYK: *Spleen Tyrosine Kinase*

T

TLR: *Toll-like receptors*

TRAF3: *Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 3*

TRRAP : *Transformation/transcription domain-associated protein*

U

UPD: *Disomie uniparentale*

UTR : *Untranslated region*

V

VAF: *Variant allele frequency*

VCAM : *Vascular cell adhesion molecule*

Vh: *Région variable de la chaîne lourde des Ig*

VIH : *Virus de l'immunodéficience humaine*

W

WGA: *Whole genomic amplification*

WT: *Wild type; allèle sauvage*

X

XLA : *Agammaglobulinémie liée à X*

RESUME

Contexte. La maladie de Waldenström (MW) est un syndrome lymphoprolifératif B caractérisé par une infiltration de la moelle osseuse par des lymphoplasmocytes et un pic monoclonal de type IgM. La mutation *MYD88L265P* est considérée comme un événement fondateur dans cette hémopathie. Les études par séquençage complet du génome ont identifié des mutations du gène *CXCR4* (*CXCR4*^{Muté}) dans la MW. *CXCR4* est un récepteur couplé aux protéines G qui participe aux processus de migration cellulaire et d'activation de différentes cascades de signalisation parmi lesquelles figurent RAS, Akt et NFkB. Les mutations de *CXCR4* joueraient un rôle important dans la physiopathologie de la MW, en particulier dans les mécanismes de chimiorésistance de certaines thérapeutiques ciblées. Notre objectif a été d'étudier le profil génomique des mutations de *CXCR4* dans la MW.

Matériel et Méthodes. Les échantillons de moelle osseuse de 98 MW (âge moyen : 67 ans) ont été analysés. L'ADN tumoral a été extrait après sélection des cellules B. Des échantillons appariés (tumeur/ lymphocytes T) ont été utilisés comme référence intra-individuelle. Les mutations de *CXCR4* ont été étudiées en séquençage ciblé à haut débit (NGS) (les 2 exons du gène *CXCR4*) ce qui a permis d'évaluer l'architecture clonale dans les cellules tumorales de MW et /ou par séquençage Sanger (SaS) (exon 2). Le spectre mutationnel de 8 gènes candidats impliqués dans les voies des Toll Like Receptor, RAS et récepteur de la cellule B (BCR) a été étudié : *MYD88L265P*, *CD79A* (domaine ITAM), *CD79B* (domaine ITAM), *CARD11* (exon 5-9), *N RAS* (exon 2-3), *K RAS* (exons 2-3), *BRAF6* (exon 15), *PTEN* (exon 5-7). L'analyse des profils génomiques selon le statut mutationnel de *CXCR4* a été réalisée en puces à SNP (single nucleotide polymorphism) (Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix chips) dans une cohorte de 53 patients pour caractériser les variations de nombre de copies (CNA) et les pertes d'hétérozygotie en l'absence de CNA. L'expression de *CXCR4* et du CD49d (VLA4) ont été étudiées en cytométrie de flux (n=53).

Résultats. Nous avons identifié dans 24.5% des MW une mutation de *CXCR4*. Toutes les mutations sont hétérozygotes, acquises et localisées dans le domaine C terminal de la protéine et conduisent à une protéine tronquée. Parmi les 17 variants observés, nous identifions 12 nouvelles mutations. Les mutations les plus fréquentes sont les variants *C1013G (S338X)* (5/98) et *C1013A (S338X)* (3/98). Les mutations de *CXCR4*^{Muté} sont associées à une plus forte expression de la protéine *CXCR4* en cytométrie de flux, indépendamment du type de mutations de *CXCR4* (n=53) (p=0.003). Aucun impact sur le niveau d'expression de l'intégrine VLA4 (CD49d), qui interagit directement avec *CXCR4*, n'est observé. Des mutations sous clonales de *CXCR4* sont identifiées en NGS dans 4/14 cas. Les mutations de *CXCR4* sont présentes dans le même clone que *MYD88 L265P*, mais sont mutuellement exclusives des mutations de la voie du BCR (*CD79A/ CD79B*). Nous avons ensuite identifié une signature génomique plus complexe dans le groupe des MW *CXCR4*^{Muté}. Les mutations de *CXCR4* sont

associées aux gains du chromosome 4 ($p=0.002$), aux gains en Xq ($p=0.002$), aux délétions 6q ($p=0.038$) et présentent un nombre d'anomalies plus élevées (5.8 versus 2.8 per patient, $p=0.046$). Nous avons ensuite cherché à caractériser le profil clinico biologique des patients MW avec mutation *CXCR4*^{Muté}. Les mutations de *CXCR4* sont associées à un pic monoclonal IgM plus élevé ($p=0.006$) et à une thrombopénie ($p=0.018$). Aucun impact sur la survie globale n'a été observé dans notre cohorte selon le statut mutationnel de *CXCR4*.

Conclusion. Notre étude a permis de décrire de nouvelles mutations de *CXCR4* dans la MW et d'identifier une signature génomique plus complexe associée dans les MW *CXCR4*^{Muté} parmi les MW *MYD88L265P*. Cette analyse des mutations de *CXCR4* a d'autre part montré l'existence d'une hétérogénéité intra-clonal (dans le clone muté *MYD88* et *CXCR4*) et interclonal (mutations du *BCR* et de *CXCR4* dans le groupe des MW mutés *MYD88L265P*). Nos résultats suggèrent donc l'existence de différents sous groupes génomiques dans la MW.

ABSTRACT

Purpose. Waldenström macroglobulinemia (WM) is a B-cell malignancy characterized by bone marrow infiltration of clonal lymphoplasmacytic cells, which produce a monoclonal immunoglobulin M (IgM). *MYD88L265P* mutation may be considered as a founder event because of its high frequency in WM. Whole-genome sequencing has revealed *CXCR4* mutations (*CXCR4^{Mut}*) in WM. *CXCR4* is a G-protein-coupled receptor that promotes migration and activation of several pathways including RAS, Akt and NFκB. *CXCR4* mutation has proved to be of critical importance in WM, in part due to its role as a mechanism of resistance to several agents of targeted therapy. We have therefore sought to unravel the different aspects of *CXCR4* mutations in WM.

Experimental Design. Bone marrow samples of 98 WM (mean age: 67 years) were analyzed. Tumoral DNA was extracted following CD19 B cell selection. Paired samples (tumor/T lymphocytes) were used as an intra-individual reference. *CXCR4* mutation was analyzed by ultra deep targeted NGS (next generation sequencing) (all exons) allowing study of the clonal architecture in WM cells and/or sanger sequencing (SaS) (exon 2). Mutational spectrum of 8 candidate genes involved in Toll Like Receptor, RAS and B Cell Receptor (BCR) pathway along with *MYD88L265P*, *CD79A* (ITAM domain), *CD79B* (ITAM domain), *CARD11* (exon 5-9), *N RAS* (exon 2-3), *K RAS* (exons 2-3), *BRAF6* (exon 15), *PTEN* (exon 5-7), was also analysed in an integrative study. Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix chips) was performed in 53 patients to decipher genomic signature of *CXCR4^{Mut}*. CN-LOH (copy neutral- loss of heterozygosity) and CNA (copy number aberration) were mapped. Flow cytometry was performed to assess *CXCR4* and CD49d (VLA4) expression (n=53).

Results. We found all mutations to be heterozygous, somatic and located in the C-terminal domain of *CXCR4* in 24.5% of the WM. *CXCR4* mutations led to a truncated receptor protein. Among the 17 variants, 12 new variants were identified in WM. The most frequent mutation was the *CXCR4 C1013G (S338X)* mutation (5/98) followed by *CXCR4 C1013A (S338X)* (3/98). Interestingly, *CXCR4^{Mut}* was associated to higher expression of *CXCR4* protein by flow cytometry, independently of the type of *CXCR4* mutation (n=53) (p=0.003). No impact on the expression profile of the integrin VLA4 (CD49d) which directly interacts with *CXCR4* was observed. Sub clonal *CXCR4* mutations were identified using NGS in 4/14 cases. *CXCR4* mutations pertain to the same clone as to *MYD88 L265P* mutations, but were mutually exclusive to *CD79A/ CD79B* mutations (BCR pathway). We identified a genomic signature in *CXCR4^{Mut}* WM traducing a more complex genome. *CXCR4* mutations were also associated with gain of chromosome 4 (p=0.002), gain of Xq (p=0.002) and deletion 6q (p=0.038) and a higher number of genomic abnormalities (5.8 versus 2.8 per patient, p=0.046). We sought to identify clinical-biologic characteristics of WM with *CXCR4^{Mut}* features. *CXCR4* mutations were associated with higher IgM monoclonal component (p=0.006) and

thrombocytopenia (p=0.018). However, no impact in overall survival was observed according to CXCR4 mutational status.

Conclusions. Our study panned out new *CXCR4* mutations in WM, and identified a specific signature associated to *CXCR4*^{Mut}, characterized with complex genomic aberrations among *MYD88L265P* WM. The study of *CXCR4* mutations showed existence of intraclonal (variation in co-expression of *MYD88* and *CXCR4* mutations) and interclonal (*BCR* and *CXCR4* mutations in *MYD88L265P* WM) heterogeneity. Our results suggest the existence of various genomic subgroups in WM.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

GLOSSAIRE

RESUME

ABSTRACT

SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION.....	11
I.1	LA MACROGLOBULINEMIE DE WALDENSTRÖM	11
I.1.1	<i>Epidémiologie.....</i>	12
I.1.2	<i>Signes cliniques.....</i>	12
I.1.3	<i>Signes biologiques.....</i>	14
I.1.4	<i>Diagnostic différentiel</i>	25
I.1.5	<i>Options thérapeutiques.....</i>	31
I.1.6	<i>Facteurs pronostiques</i>	37
I.2	PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MACROGLOBULINEMIE DE WALDENSTRÖM.....	40
I.2.1	<i>Apport du séquençage complet du génome dans la MW : Identification de la mutation MYD88L265P</i>	40
I.2.2	<i>Altération de l'axe CXCL12/CXCR4 et Mutations de CXCR4.....</i>	50
I.2.3	<i>Autres mutations identifiées dans la MW</i>	58
I.2.4	<i>Profilage génomique dans la MW</i>	59
I.2.5	<i>Analyse de la signature transcriptionnelle de la MW.....</i>	64
I.2.6	<i>Epigénétique.....</i>	67
I.2.7	<i>L'origine des cellules tumorales de la MW</i>	68
I.2.8	<i>MGUS- IgM : diagnostic différentiel ou stade pré Waldenström ?</i>	72
I.2.9	<i>Interaction microenvironnement et cellules tumorales dans la MW</i>	75
I.2.10	<i>Altération de la voie du BCR dans la Maladie de Waldenström :.....</i>	79
II.	OBJECTIF DE THESE	85
III.	MATERIEL ET METHODE	86
III.1	PATIENTS	86
III.2	ISOLEMENT CELLULAIRE	87
III.2.1	<i>Isolement des cellules mononucléées.....</i>	87
III.2.2	<i>Cryopréservation en azote liquide.....</i>	87
III.2.3	<i>Tri cellulaire immunomagnétique</i>	87
III.3	EXTRACTION D'ADN	88
III.4	ETUDE PAR SEQUENÇAGE DE NOUVELLE GENERATION	89
III.4.1	<i>Préparation des librairies</i>	90
III.4.2	<i>PCR en émulsion et enrichissement.....</i>	91
III.4.3	<i>Etape de séquençage.....</i>	92

III.4.4	Analyse des données	92
III.5	PCR DE SEQUENÇAGE DE TYPE SANGER	93
III.5.1	Principe.....	93
III.5.2	Protocole et analyse des données :	94
III.6	ANALYSE PAR PUCES A SNP :	95
III.7	ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE CXCR4 ET D'AUTRES MARQUEURS EN CYTOMETRIE EN FLUX (CMF)	97
III.8	L'ANALYSE DU TRANSCRIPTOME	99
III.8.1	Principes de l'analyse transcriptionnelle	99
III.8.2	Analyse des données	99
III.9	ANALYSE STATISTIQUE	100
IV.	RESULTATS	101
IV.1	DE NOUVELLES MUTATIONS DE CXCR4 IDENTIFIEES DANS LA MW	101
IV.2	ANALYSE DE LA CHARGE MUTATIONNELLE DE CXCR4 ET MYD88L265P EN NGS	103
IV.3	SIGNATURE IMMUNOPHENOTYPIQUE ASSOCIEE AU GROUPE CXCR4 ^{MUTE}	105
IV.3.1	Expression de CXCR4	105
IV.3.2	Expression du CD49d	105
IV.3.3	Autres marqueurs.....	109
IV.4	PAYSAGE MUTATIONNEL DES MUTATIONS CXCR4	109
IV.5	ANOMALIES GENOMIQUES ASSOCIEES AUX MUTATIONS CXCR4	112
IV.6	ANALYSE DU PROFIL TRANSCRIPTOMIQUE SELON LE STATUT MUTATIONNEL DE CXCR4.....	116
IV.7	ETUDE DE LA VALEUR PRONOSTIQUE CLINIQUE DES MUTATIONS DE CXCR4	120
IV.7.1	Profil clinico biologique des patients MW avec mutation CXCR4.....	120
IV.7.2	Etude de la valeur pronostique clinique des mutations de CXCR4.....	122
V.	DISCUSSION	123
VI.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	133
VII.	BIBLIOGRAPHIE	135
VIII.	ANNEXE 1	160
IX.	ANNEXE 2.....	187
X.	ANNEXE 3.....	195

I. INTRODUCTION

I.1 LA MACROGLOBULINEMIE DE WALDENSTRÖM

Jan Waldenström a rapporté, en 1944, les cas de deux patients présentant des adénopathies, une asthénie et des épistaxis. Sur le plan biologique, une anémie et une thrombopénie sont observées à l'hémogramme. Au myélogramme, un infiltrat à prédominance lymphocytaire est mis en évidence. Une augmentation de la vitesse de sédimentation ainsi qu'une hyperviscosité sérique initialement attribuée à une protéine de haut poids moléculaire anormale est décrite (312). Quelques années plus tard, le développement des techniques d'électrophorèse des protéines sériques permettra l'identification de la macroglobuline anormale comme une immunoglobuline monoclonale de type IgM.

La macroglobulinémie de Waldenström (MW ou maladie de Waldenström) est définie comme une hémopathie lymphoïde chronique de type B que la classification de WHO (*World Health Organization*) a rattachée aux lymphomes lymphoplasmocytaires (336). Le *IIth International workshop on Waldenström Macroglobulinemia* à Athènes a proposé l'utilisation de différents critères diagnostiques (225) :

- Détection d'un composant monoclonal sérique d'isotype IgM quelle que soit sa concentration
- Infiltration de la moelle osseuse (MO) par un continuum lymphoplasmocytaire constitué de lymphocytes, de lymphoplasmocytes et de plasmocytes
- Infiltration le plus souvent de type intratrabéculaire mise en évidence lors de la biopsie ostéomédullaire (BOM)
- Caractérisation immunophénotypique de la population clonale lymphoïdes B associant l'expression d'une IgM⁺ membranaire clonotypique, de marqueurs pan B (CD19⁺, CD20⁺), ainsi qu'une expression du CD22⁺, FMC7, CD38⁺, CD27⁺, CD5[±], CD23[±].

La récente publication de la révision de la classification OMS des hémopathies lymphoïdes a individualisé la maladie de Waldenström qui présente dans 80 à 90% des cas la mutation *MYD88L265P* (286). Le groupe de travail, formé lors du *VIIth International Workshop on Waldenström Macroglobulinemia* de Londres en 2014, a actualisé la stratégie diagnostique de la MW en incluant la recherche de la mutation *MYD88L265P* (57).

I.1.1 EPIDEMIOLOGIE

La maladie de Waldenström est une hémopathie lymphoïde rare dont l'incidence estimée est de 3 à 4 cas par million d'habitants et par an (6, 55, 98). Cette incidence est probablement sous-estimée par l'absence d'exploration biologique approfondie, en particulier la réalisation d'une biopsie ostéomédullaire (BOM)) conduisant au diagnostic de MW chez les patients asymptomatiques, âgés ou en l'absence de cytopénies (307). L'âge médian des patients atteints de MW varie entre 63 et 68 ans. Une prédominance masculine (55 à 70 %) est observée (6, 55). La fréquence de la MW est plus élevée chez les caucasiens que dans la population afro américaine. La MW reste aujourd'hui une hémopathie considérée comme incurable malgré de nombreuses avancées thérapeutiques (79). La médiane de survie est estimée à environ 8 ans à partir de 2000 (55, 56, 303).

Alors que l'étiologie de la MW demeure inconnue, différents facteurs de risque ont été identifiés :

- Des facteurs environnementaux (solvants organiques, pesticides, ...) (153,154)
- Les patients présentant des antécédents familiaux de MW, de MGUS à IgM ou d'un autre syndrome lymphoprolifératif en particulier chez les apparentés du premier degré (153, 154, 208, 296)
- Les études génétiques de déséquilibres de liaison ont suggérés l'existence de facteurs génétiques impliquant les locus en 1q et 4q dans les formes familiales de MW (200). Les analyses de séquençage complet de l'exome ont identifié 2 polymorphismes (*LAPTMS C403R* et *HCLS1 G496A*) associés à la MW (261)
- Des maladies auto-immunes ou infections. Le rôle de HSV-8 et du virus de l'hépatite C demeure toutefois discuté (111, 153, 154, 167)
- La préexistence d'une MGUS à IgM (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*) augmente le risque de développer une MW de 46 fois. Le taux de progression d'une MGUS à IgM vers une MW est évalué à 1,5-2 % par an (157, 158, 201).
- L'hyperphosphorylation de la protéine paratarg-7 (P-7) est observée dans les MGUS à IgM et la MW et semble associée à une augmentation du risque de développer une MW ou une MGUS (105)
- Le risque de survenue de second cancer est discuté (308).

I.1.2 SIGNES CLINIQUES

La Maladie de Waldenström est une hémopathie hétérogène sur le plan de sa présentation clinique et biologique. Sa découverte peut être fortuite lors de l'exploration d'une autre pathologie ou d'un bilan biologique systématique. Une élévation de la vitesse de sédimentation (VS) ou l'existence

d'un pic monoclonal de type IgM est alors dépisté à l'électrophorèse des protéines sériques (EPS). Une maladie dite indolente ou asymptomatique (*smoldering Waldenström Macroglobulinemia*) est observée chez environ 30 % des patients (156, 206, 303).

Des signes cliniques non spécifiques tels qu'une asthénie, plus rarement des sueurs nocturnes, une fièvre ou fébricule vespérale, un amaigrissement peuvent conduire au diagnostic de MW. Schématiquement, les symptômes observés dans la MW sont liés soit à l'infiltration par les lymphoplasmocytes de la MO ou d'autres organes lymphoïdes soit à l'importance du pic monoclonal IgM et/ou de l'activité auto-immune de l'immunoglobuline monoclonale (181, 245, 303).

A. L'infiltration tumorale

L'infiltration de la moelle osseuse par les lymphoplasmocytes peut entraîner une insuffisance médullaire qui se traduit par la survenue de cytopénies (anémie, thrombopénie, plus rarement des neutropénies). Une lymphocytose sanguine peut être décrite chez moins de 15 % des patients. Moins de 20 % des patients atteints de MW présentent des adénopathies, une hépatomégalie et ou une splénomégalie (89, 94, 303). La réalisation d'un bilan complet d'imagerie ainsi qu'une biopsie pour un examen anatomopathologique doit être envisagée en cas de suspicion de transformation en DLBCL (19, 20, 54). Cette transformation en lymphome de haut grade est peu fréquente (incidence cumulative à 15 ans : 3.8%) (57B).

Une localisation extramédullaire est observée dans moins de 5% des cas. Dans un tiers des cas, cette infiltration extramédullaire par des cellules tumorales est mise en évidence au diagnostic : il ne s'agit donc pas uniquement d'une complication tardive de la MW (20, 180). Ainsi, sont décrites des localisations pulmonaires, des tissus mous,.... L'existence de lésions cutanées doit faire discuter d'un syndrome de Schnitzler (245). Bien que la survenue de complications rénales soient observées à une incidence d'environ 5% à 15 ans, l'infiltration par des cellules tumorales ne représente que 20% des cas (311B). Des atteintes du système nerveux central (SNC) sont rares et correspondent au syndrome de Bing Neel qui peut constituer la forme révélatrice de la MW dans un tiers des cas ou survenir après plusieurs mois d'évolution de l'hémopathie (54, 249, 278). Le syndrome de Bing Neel peut survenir en l'absence de tout signe de progression de la MW (278). Le tableau clinique est très variable. Les principaux diagnostisc différentiels sont un syndrome d'hyperviscosité ou un lymphome cérébral de type diffus à grandes cellules B primitif ou secondaire.

B. L'IgM monoclonale

Un syndrome d'hyperviscosité au diagnostic peut être observé chez environ 15% des MW. Sa présentation peut comprendre des rétinopathies avec troubles visuels (l'examen du fonds d'œil est alors caractéristique), des épistaxis, ou des signes neurologiques (céphalées,..) ou cardiaques. L'IgM

est une immunoglobuline de taille importante, une concentration élevée de ce composant monoclonal peut être associée au syndrome d'hyperviscosité (285). Ce syndrome peut être secondaire à un effet « *flare* » lors de l'initiation du traitement : il convient alors de s'assurer de l'absence de progression de la maladie par un bilan d'imagerie par exemple (57).

Des troubles de l'hémostase peuvent être observés dans la MW et être parfois associés à un syndrome hémorragique (82). Ainsi, des anomalies de la coagulation de type hémophilie ou maladie de Willebrand acquises (environ 13% des cas), des thrombopathies ou des défauts de fibrinoformation par interaction des plaquettes avec l'IgM sont rapportés dans cette hémopathie. Des déficits de facteurs de la coagulation ont été décrits (82,120). Un risque accru de maladie thromboembolique veineuse est observé dans la MW (128).

Une cryoglobulinémie de type I ou II est mise en évidence dans environ 20% des cas (89,99). Toutefois, elles seront symptomatiques dans moins de 5 % des cas (purpura, syndrome de Raynaud, ulcères cutanés, arthralgies). Le dépôt du composant monoclonal dans les tissus (glomérules rénaux, intestin, peau) peut entraîner d'autres symptômes : diarrhées, syndrome néphrotique (une insuffisance rénale est rarement décrite), une amylose (2 % des patients) (57, 226, 245)

C. L'activité auto-anticorps de l'IgM :

Des neuropathies périphériques sont décrites dans 15 à 30 % des MGUS à IgM et des MW. Le plus fréquemment, des anticorps anti MAG (*Myelin Associated Glycoprotein*) sont dépistés (16). Les spécificités anticorps de l'IgM au niveau de la membrane basale glomérulaire peuvent conduire à la survenue de glomérulonéphrites (89).

Une anémie hémolytique auto-immune (AHAI) est décrite au diagnostic ou en cours de suivi dans 10 à 15 % des cas (241). Une hémolyse chronique avec des titres élevés d'agglutinines froides (AF) est mise en évidence chez 10 % des patients. Les thrombopénies auto-immunes (PTAI) sont peu fréquentes (89, 94, 226).

I.1.3 SIGNES BIOLOGIQUES

Le diagnostic de MW doit être évoqué lors de la mise en évidence de l'IgM monoclonale par une électrophorèse des protéines sériques couplée à une immunofixation ainsi que la présence d'une population lymphoplasmocytaire clonale dans la moelle osseuse identifiée par un immunophénotypage.

A. Bilan biochimique

Dans la MW, les anomalies biochimiques les plus fréquemment observées sont une hyperprotidémie et une augmentation de vitesse de sédimentation. Un pic monoclonal de type IgM est alors mis en évidence à l'électrophorèse des protéines. L'immunofixation caractérise et quantifie le composant de type IgM, le plus souvent κ . Deux pics peuvent parfois être détectés : il s'agit soit de vraies biclonalités ou d'associations de monomères ou de formes pentamériques de l'IgM (89). Il n'est pas recommandé d'utiliser des méthodes néphélométriques pour doser l'IgM. Une diminution des taux des IgA et IgG est observée dans environ deux tiers des cas (57, 89, 130). Une hypoalbuminémie peut être mise en évidence. Des taux élevés d'IgM peuvent entraîner des interférences perturbant l'interprétation de certains dosages biochimiques (bilirubine,...). De même, la présence d'une cryoglobuline peut sous estimer la quantification du pic IgM (282).

Une augmentation des chaînes légères libres (FLC) avec modification du ratio κ/λ est observée dans environ 80% des cas (134, 169). L'intérêt du dosage des chaînes lourdes libres des IgM est en cours d'évaluation (37). Une augmentation de β -2 microglobuline est peu fréquente chez les patients asymptomatiques. Le taux de β 2 est inclus dans le score pronostic de l'IPSSWM (205, 206). Dans 50 % des cas, une protéinurie de Bence Jones peut être mise en évidence (206). En revanche, les signes biologiques d'insuffisance rénale ou d'hypercalcémie sont peu fréquents dans la MW. Toutefois, des localisations rénales de l'hémopathie sont à rechercher en cas de perturbation du bilan rénal en l'absence d'autres étiologies. Les néphropathies à cylindres sont rares dans la MW (57, 98, 104).

B. Hémogramme

L'hémogramme est normal dans environ deux tiers des cas au diagnostic, en particulier chez les patients en phase asymptomatique (94, 156).

Les anomalies les plus fréquemment observées sont les suivantes (89) :

- Discrète leucopénie ou hyperleucocytose modérée associée à une lymphocytose. Des neutropénies sévères le plus souvent de type autoimmune sont rares. Des hématies en rouleaux et de rares lymphoplasmocytes peuvent être alors observés même en l'absence d'une lymphocytose à la formule sanguine.
- Une anémie d'importance variable souvent d'origine multifactorielle est détectée dans un tiers des cas (94). Des explorations complémentaires doivent donc être envisagées pour établir le lien avec la MW en particulier chez les sujets âgés (57). C'est en effet l'un des motifs principaux de consultation médicale et de décision de traitement. L'anémie est présente dans 80% des formes de MW symptomatiques. Son étiologie peut associer un mécanisme d'hémodilution qui peut aussi entraîner une modification de la synthèse d'érythropoïétine, d'anomalie du bilan martial par sécrétion anormale d'hepcidine par les cellules tumorales,

d'insuffisance médullaire ou encore d'anémie hémolytique autoimmune avec un test de Coombs positif (67, 89, 241, 279).

- Une thrombopénie < 100 G/l est peu fréquente (15% des cas). Le plus souvent une thrombopénie modérée est détectée, parfois associée à des thrombopathies par mécanismes d'absorption de l'immunoglobuline monoclonale sur la membrane plaquettaire. Une thrombopénie majeure doit faire rechercher un PTAI (94, 226).
- Un tableau de pancytopénie peut être présent dans les formes symptomatiques.

En cas de cytopénies en l'absence de modification du pic IgM, il convient d'exclure la survenue d'un syndrome myélodysplasique en particulier après traitement par des agents alkylants et chez des sujets âgés (172, 303).

C. Cytologie : Myélogramme et biopsie ostéomédullaire

Le myélogramme est l'examen indispensable au diagnostic de la MW. Les frottis montrent le plus souvent une richesse normale ou diminuée de la MO et une infiltration par un continuum lymphoplasmocytaire composé de lymphocytes, de lymphoplasmocytes et de plasmocytes (Figure 1). L'aspect lymphoplasmocytaire doit être recherché avec attention en particulier en l'absence de lymphocytose médullaire ou de moelle pauvre (89).

Le recours à une BOM est indispensable pour confirmer le diagnostic en cas de suspicion d'hémodilution ou de MO non contributive pour le diagnostic où l'observation de rares cellules anormales ne permet pas d'affirmer le diagnostic (Figure 2). En effet, la BOM permet de caractériser et de quantifier l'infiltrat lymphoïde constitué par un *continuum* lymphoplasmocytaire. L'observation de corps de Dutcher est possible. La présence de mastocytes est rapportée dans environ un quart des cas (89, 295). L'infiltration tumorale combine des aspects interstitiels ou diffus, parfois associés à des amas nodulaires ou paratrabéculaires. Les infiltrations intra sinusales sont rares (9). Une myélofibrose de type réticulinique peut être mise en évidence par technique d'imprégnation argentique. Cette fibrose médullaire peut en partie expliquer les difficultés des prélèvements des myélogrammes parfois non contributifs par hémodilution dans cette pathologie. Toutefois, la BOM n'est pas toujours réalisée pour poser le diagnostic (refus du patient, âge avancé, absence d'indications de traitement, traitement anticoagulant,...) (89, 303,307).

Si des localisations extra médullaires sont suspectées devant un tableau clinique particulier ou lors de la réalisation d'imagerie, d'autres biopsies peuvent être réalisées pour prouver l'infiltration tumorale (20, 180). Une biopsie ganglionnaire ou une splénectomie peut être envisagée en cas de syndrome tumoral (adénopathies ou splénomégalie) pour confirmer le diagnostic ou éliminer une transformation en lymphome diffus à grandes cellules B (20,303). Devant certains tableaux de signes

neurologiques, une ponction lombaire est réalisée pour affirmer un diagnostic de syndrome de Bing Neel en complément d'une analyse histologique (biopsie stéréotaxique) (54, 278). La présence de lymphoplasmocytes peut alors être mise en évidence. Toutefois, l'absence de cellules lymphoplasmocytaires n'exclut pas le diagnostic de ce syndrome (249, 278).

Figure 1. Aspect cytologique au myélogramme (coloration au May Grunwald Giemsa) présentant différents profils cytologiques avec une infiltration par un *continuum* lymphoplasmocytaire (A-E). **B:** Présence d'hématies en rouleaux sur le frottis de sang indiquée par la flèche; la présence du pic monoclonal IgM réduit la charge négative des hématies, favorisant leur 'empilements'. **E :** Mastocyte indiqué par la flèche (objectif x50).

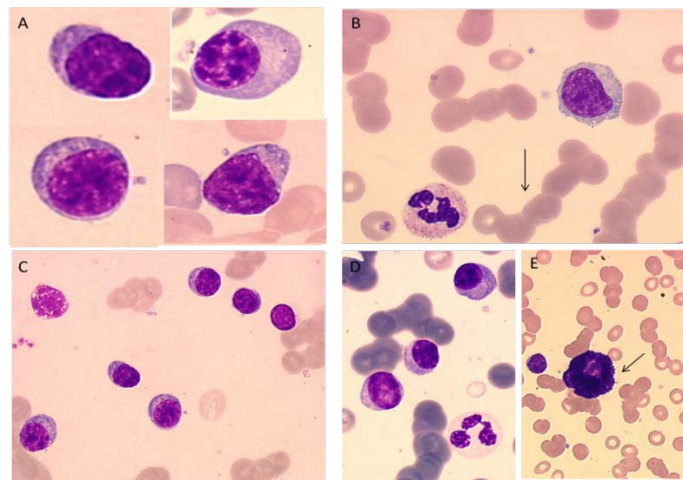
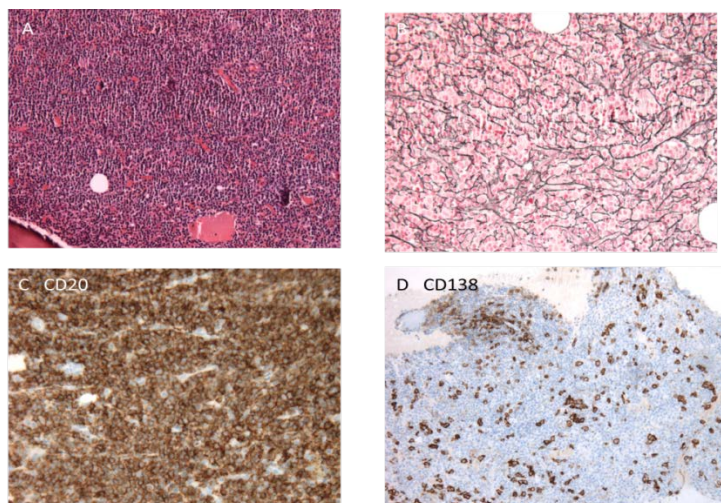


Figure 2 : Aspect histologique de la biopsie ostéomédullaire. **A** Infiltration par des cellules de morphologie lymphoplasmocytaire, HES (hémateïne, éosine, safran), (objectif x20) **B** Mise en évidence d'une fibrose réticulinique à la coloration de Gordon,(objectif x20) **C** Infiltrat diffus CD20+ en immunohistochimie, (objectif x20) **D** Présence d'un contingent cellulaire à différenciation plasmocytaire CD138+ en immunohistochimie, (objectif x20). Images transmises par le Dr Romain Dubois, Service d'Anatomopathologie, CHU de Lille.



D. Immunophénotypage

Un immunophénotypage est réalisé en cytométrie en flux à partir de la MO ou en immunohistochimie sur la BOM afin de confirmer la clonotypie des cellules tumorales et la nature lymphoïde B (57, 226). L'analyse immunophénotypique est particulièrement utile en cas de faible infiltration au myélogramme et participe également au diagnostic différentiel avec les autres hémopathies lymphoïdes B (225, 226, 230, 269). L'immunomarquage de la tryptase peut confirmer sur BOM la présence de mastocytes qui présentent par ailleurs un immunophénotype normal (CD2⁻, CD25⁻, CD117⁺) (269, 295). La réalisation de l'immunophénotypage sur le sang peut être envisagée en cas de lymphocytose. En effet, des sous-populations clonales B peuvent être détectées en cytométrie en flux dans près de 50% des cas même en l'absence de lymphocytose (166). Toutefois, le diagnostic de MW reste avant tout médullaire. En cas de localisation extra médullaire, d'autres tissus ou liquides biologiques peuvent être analysés (57, 226). L'exploration immunophénotypique associée à la cytologie du liquide céphalo rachidien est par exemple utile au diagnostic de syndrome de Bing Neel (54, 278).

Le score de Matutes est le plus souvent inférieur à 3 : le profil immunophénotypique identifié ne posera pas le diagnostic de MW mais orientera le diagnostic (Tableau 1) (129, 146, 155, 207, 220, 228, 230, 234, 269). Une expression modérée à forte des Ig de surface le plus souvent κ est observée. Une augmentation du pourcentage de clonotypie évaluée par l'existence d'une restriction complète des chaînes légères est rapportée entre le groupe des MW indolents et les MW symptomatiques qui présentent une plus forte masse tumorale (230). Le profil d'expression de CD5 est variable d'une étude à l'autre (5 à 43 %) (228). Le CD23 peut être exprimé dans le MW mais à un niveau faible et plutôt dans les MW de type symptomatiques (129). Toutefois, la co-expression CD5/CD23 est rare dans la MW (129, 230).

Une expression du récepteur à l'IL-2, le CD25, peut être observée dans près de 90% des cas de MW. Ainsi, le profil CD25⁺/CD22⁺/CD11c faible est plus classiquement observé dans la MW (220, 230). Le CD103 est constamment négatif (220, 230). Dans une large cohorte de MW au diagnostic, l'utilisation d'un panel d'immunophénotypage en cytométrie en flux multiparamétrique 8 couleurs a permis récemment la description d'un profil phénotypique « typique » de la MW : CD22^{low}/CD23-/CD25+/CD27+/SIgM+ (230). C'est donc l'analyse de la combinaison du profil d'expression des différents marqueurs étudiés qui contribuera à poser le diagnostic de MW. Ces données restent à confirmer par des études indépendantes en particulier pour standardiser les variations relatives du niveau d'expression du panel de marqueur proposé.

Une hétérogénéité intraclonale a été rapportée dans la MW (269). Un arc de différenciation immunophénotypique du lymphocyte au plasmocyte traduit le continuum lymphoplasmocytaire des cellules tumorales. Le CD38, un marqueur plasmocytaire, est exprimé de façon hétérogène par les cellules B dans la MW dans 30 à 60% des cas (228, 230). Le CD138 est exprimé non seulement par la

population plasmocytaire du clone MW mais aussi par les lymphocytes CD19⁺ (155). Une population de plasmocytes clonaux, qui peut aussi présenter un phénotype aberrant (CD38⁺, CD19⁺, CD56⁻, CD45⁺ et parfois CD20⁺), est observée (269). La fréquence d'expression du CD138 (syndecan-1) varie de 0 à 60 %. Le profil d'expression reste toutefois discuté selon les techniques utilisées (cytométrie en flux, immunohistochimie), les seuils de positivité utilisés et la population cellulaire ciblée (225-6, 230).

De nouveaux marqueurs sont en cours d'évaluation. Le CD180 est plus fortement exprimé par rapport au lymphocyte B normal mais son profil d'expression est plus faible que celui observé dans les lymphomes de la zone marginale (195). Un niveau d'expression plus faible du CD200 en comparaison à la leucémie à tricholeucocytes peut être détecté (222, 237).

Table 1 : Profil immunophénotypique dans la maladie de Waldenström (129, 146, 195, 222, 225, 228, 230, 237, 269)

Marqueurs		Pourcentage (%) des cas positifs	Profil d'expression
Clonalité	IgM +++	100	Expression modérée à forte 90% kappa (k)/ 10% lambda (λ)
	Ig de surface	100	
Phénotype B	CD19	100	Forte intensité
	CD20	100	Forte intensité
	CD5	6 à 61	De faible intensité, rare coexpression avec le CD23
	CD23	12 à 61	Faible intensité
	CD22	85	Faible intensité
	CD79b	38 à 84	
	FMC7	5 à 43	
Marqueurs Plasmocytaires	CD38	20 à 70	Profil d'expression variable selon les études. Expression à la fois par le contingent lymphocytaire et plasmocytaire
	CD138	<60	Marqueur associé au contingent plasmocytaire. Faible expression par la population B
	IRF4		Corrélié au contingent plasmocytaire
Lymphocytes mémoires	CD27	42 à 66	Faible à fort
Autres	CD43	<20	Faible niveau d'expression
	CD10	0 à 18	Faible positivité si marqueur présent
	CD103	0	Constamment négatif
	CD25	> 70	Expression homogène
	CD11c	11 à 31	Faible niveau d'expression
	CD52	100	Constamment positif
	CD200		Faible niveau d'expression
	CD180		Faible niveau d'expression
	Bcl6		Négatif
	Bcl2		Positif
	Cycline D1 /SOX11		Négatif

E. Cytogénétique de la MW

L'intérêt du caryotype a longtemps été discuté dans le MW. En effet, le faible index mitotique des cellules tumorales entraîne des taux d'échecs élevés en cytogénétique conventionnelle en l'absence de protocole de stimulation (28, 60, 272). Les premières analyses cytogénétiques ont été rapportées dans des cohortes de petite taille et souvent hétérogènes sur le plan clinique en incluant des diagnostics et des rechutes après traitement. Toutefois, le caryotype permet de mettre en évidence une anomalie clonale chez 40 à 50% des cas (28, 221, 272) (Table 2). En revanche, aucune anomalie spécifique de la MW n'a pu être identifiée. Les translocations impliquant le locus 14q32 sont rares, la t(9;14) étant principalement associée aux lymphomes lymphoplasmocytaires et non à la MW comme initialement décrit (272). En revanche des translocations souvent déséquilibrées sont observées en particulier dans les caryotypes complexes (218).

L'étude d'une cohorte de 171 patients atteints de MW menée par l'équipe de F Nguyen-Khac *et al* a permis de confirmer l'intérêt de nouveaux protocoles de stimulation *in vitro* (DSP 30+IL2) et préciser la fréquence de la plupart des anomalies cytogénétiques précédemment décrites (218). Les techniques d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) ont précisé la fréquence des principales anomalies chromosomiques précédemment identifiées par la cytogénétique dans la MW (40, 221, 247). L'intérêt principal de la cytogénétique associée au FISH réside dans l'orientation diagnostic en cas de difficulté diagnostic avec une autre hémopathie lymphoïde (absence de t(11; 14), recherche de délétion 6q,...). Le faible infiltrat tumoral dans les prélèvements de moelle osseuse souvent associée à une part d'hémodilution peut limiter l'informativité de ces analyses en pratique clinique. La réalisation du caryotype ne fait donc pas partie des analyses recommandées pour le diagnostic de la MW mais s'avère utile dans le cadre de la démarche de diagnostic différentiel (57).

La délétion du bras long du chromosome 6 (6q) est l'anomalie la plus fréquemment observée dans la MW (30 à 60 % des cas). Sa fréquence varie selon les techniques (caryotype / FISH) et les sondes utilisées pour la rechercher (60, 206, 221). Les monosomies du chromosome 6 sont rares. Dans 10 à 20% des cas, une trisomie 4 totale ou partielle est mise en évidence (218, 292). C'est dans la MW que la trisomie 4 est le plus fréquemment observée parmi les autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (39, 40). Elle est rarement isolée au caryotype : une association trisomie 4 et 18 est décrite (218). D'autre part, les trisomies 4 partielles peuvent être la conséquence de translocations déséquilibrées impliquant le chromosome 4 (248).

Les délétions 13q14 et 17p13 sont des anomalies peu fréquentes au diagnostic. En revanche, ces anomalies sont plus fréquemment observées à la rechute ou en phase de progression (273). Les caryotypes complexes à plus de 3 anomalies sont décrits dans environ 15% des cas. Leur signification pronostique reste à évaluer mais ils sont associés à présence de délétion 17p (218). Des formules chromosomiques évoquant l'existence d'une évolution clonale par acquisition d'un sous clone avec des anomalies additionnelles sont rapportées (248).

Table 2 : Anomalies cytogénétiques décrites dans la maladie de Waldenström (22, 40, 60, 206, 218, 221, 248, 272)

Anomalies cytogénétiques	Fréquence (%)
Anomalies clonales	35 à 58
Délétion 6q	30 à 60
Translocations	15
Trisomie 4 (partielle et totale)	12 à 20
Trisomies 18	10 à 18
Délétion 17p (<i>TP53</i>)	7 à 15
Délétion 13q14	2 à 16
Caryotype complexe (> 3 anomalies)	12
Trisomie 12	<5
Délétion 11q23 (<i>ATM</i>)	10
Trisomie 3/ 3q	<10
Réarrangement en 14q32 / Translocations impliquant le locus 14q32	<5
Monosomie 7/ Délétion 7q	<5
Perte de chromosome sexuel isolée ou associée	15

F. Mutation MYD88L265P

La mutation *MYD88L265P* est rapidement devenue un biomarqueur diagnostique de la MW au regard de sa fréquence élevée dans la MW et a été initialement décrite par l'étude du séquençage complet du génome dans une cohorte de 30 patients (299). Environ 80 à 90% des MW présentent une mutation *MYD88L265P* (138, 246, 299). Cette mutation gain de fonction est somatique et le plus fréquemment hétérozygote. De rares cas d'homozygote sont rapportés (<10% des cas), et le plus souvent associée à une disomie uniparentale acquise dont la signification clinique n'est pas définie (131, 246, 299). La recherche de *MYD88L265P* sur prélèvement médullaire est désormais recommandée depuis VIIth Workshop de Londres en 2014 et intégrée à la description de la MW par la mise à jour de la classification OMS (57, 286).

La mutation *MYD88L265P* a été également détectée dans le sang des patients atteints de MW dans environ deux tiers des cas. Une concordance totale avec les résultats obtenus dans le prélèvement de MO est observée lorsque la mutation est recherchée dans les lymphocytes CD19⁺ isolés à partir du sang (334). Toutefois, la MW est avant tout caractérisée par une infiltration médullaire de cellules lymphoplasmocytaires qui reste le critère diagnostique principal : la mutation *MYD88L265P* doit être avant tout recherchée sur prélèvement de moelle osseuse (57). D'autres types de prélèvements comme

le liquide céphalo rachidien dans le syndrome de Bing Neel peuvent être utilisés pour analyser cette mutation, en particulier pour établir le diagnostic de forme extramédullaire de la MW (249).

De nombreuses techniques ont été mises au point ou utilisées pour mettre en évidence la mutation *MYD88L265P* (6, 24, 93, 112, 138, 246, 299, 300, 305). Il n'existe pas de méthode standardisée recommandée ni de critère de positivité en termes de pourcentage de cellules mutées *MYD88L265P* pour poser le diagnostic de MW (57). En revanche, l'utilisation d'une technique sensible avec un seuil de détection bas est indispensable pour l'analyse des échantillons en pratique clinique. De ce fait, l'analyse par séquençage Sanger est peu adaptée par son manque de sensibilité à la recherche de mutation *MYD88L265P* dans des échantillons non triés de MO de patients (109, 246). D'autre part, le tri de cellules tumorales est principalement réalisé à visée de recherche. Aucune recommandation sur le type de méthode de sélection des cellules tumorales à envisager n'est à ce jour publiée (40, 231). Récemment, il a été montré que la mutation *MYD88L265P* peut être présente dans le compartiment plasmocytaire résiduel après immunothérapie par rituximab ce qui suggère la nécessité d'analyser l'ensemble du compartiment tumoral dans la MW (109, 299). La détection de la mutation ponctuelle *MYD88L265P* est possible par différentes approches de PCR en temps réel permettant d'atteindre le seuil de sensibilité nécessaire (138, 249, 334).

Le diagnostic de MW ne peut être exclu uniquement sur la base de l'absence de mutation *MYD88L265P*. D'autres mutations de *MYD88* (*MYD88M232T*, ..) ont été rapportées récemment dans la MW (34, 68, 302). La recherche de ces autres mutations de *MYD88* en séquençage à haut débit (NGS) pourrait donc être envisagée en seconde intention en l'absence de mutation *MYD88L265P* (57, 109). *A contrario*, le diagnostic de MW ne peut être posé que par la détection de mutation *MYDL265P* : cette mutation peut en effet être mise en évidence dans d'autres hémopathies lymphoïdes B associée ou non à une différenciation lymphoplasmocytaire (8, 34, 35, 229, 251, 305). Le diagnostic de la MW intègre donc un ensemble de critères à la fois biochimiques, cliniques, cytologiques, immunophénotypiques et moléculaires (57, 89, 225) (Tableau 3).

Table 3 : Stratégie diagnostique recommandée pour la MW, adaptée de (57, 89, 225).

Bilan Hematologique	
Numération formule sanguine	Anémie normocytaire normochrome. Macrocytose possible (le volume globulaire moyen peut être faussement macrocytaire en raison d'une pseudo agglutination liée à l'IgM), éliminer les autres causes d'anémies. Numération des réticulocytes en cas d'anémie Thrombopénie (< 15%). Origine auto immune à explorer Lymphocytose rare et modérée (rarement >15 G/l). Pancytopénie peu fréquente
Frottis sanguins	Frottis sanguins : Présence d'hématies en rouleaux. Observation de lymphoplasmocytes possible même en l'absence de lymphocytose. En cas de neuropénie, rechercher une hypogranulation ou autres signes évoquant un syndrome myélodysplasique secondaire
Bilan d'hémolyse	Augmentation du taux de reticulocytes (en cas d'Anémie hémolytique auto immune), bilirubine, haptoglobine, LDH (lactate dehydrogenase) Test de Coombs (positif dans environ 10% des cas, 5% d'anémies hémolytiques autoimmunes) Recherche d'agglutinines froides
Bilan d'hémostase	Réalisation des tests globaux à la recherche d'une Maladie de Willebrandt acquise ou d'hémophilie acquise si allongement du TCA (temps de céphaline activée) en particulier ou syndrome hémorragique Thrombopathie acquise possible
Moelle osseuse	
Analyse cytologique et histologique	Infiltration par un continuum lymphoplasmocytaire (petits lymphocytes à différenciation plasmocytaire et plasmocytes) Présence d'un excès de mastocytes sans anomalies cytologiques dans environ 30% des cas. Biopsie ostéomédullaire à envisager en l'absence d'une infiltration nette de la moelle osseuse ou de profil immunophénotypique. Confirmation d'un infiltrat tumorale >10%
Immunophénotype	Score de Matutes < 3 sIg+, Rare coexpression du CD5 et CD23, CD19+, CD20+, CD22+, CD79+, CD5+/-, CD23+/-, CD138+/-, CD10-, CD103-, CD27+
Cytogénétique	Absence d'anomalies cytogénétique pathognomonique de la WM : exclusion des anomalies associées à d'autres hémopathies B comme le lymphome du manteau,...

	Délétion 6q détectée par FISH dans 30-50% des cas. Trisomie 4 dans 8- 20% des cas. Délétion 7q, trisomie 12 et 18 peu fréquentes. Absence de valeur pronostique à l'exception de la délétion 17p (en cours d'évaluation protocolaire)
Biologie Moléculaire	Mutation <i>MYD88 L265P</i> dans 80 à 90% des cas Recherche de mutation de <i>CXCR4</i> en cours d'évaluation pour identifier un profil chimio résistant à certains agents pharmacologiques (ibrutinib) et orienter la prise en charge thérapeutique (en cours d'évaluation)
Bilan biochimique	
Electrophorèse des protéines sériques, Immunofixation	Pic monoclonal parfois sous-estimé par la présence d'une cryoglobuline, à envisager en cas de suspicion clinique ou biologique (prélèvement à 37°C). Faible sensibilité si faible taux d'IgM ou défaut de migration Dépister ou suivre une hypogammaglobulinémie associée (à réaliser au diagnostic et en suivi)
Protéinurie	Importante à envisager si une hypoalbuminémie est détectée (glomérulopathie de type cryoglobulinémie, amylose AL, infiltration rénale par des cellules tumorales,..), et qui peut être explorée par une bandelette urinaire Electrophorèse des protéines sériques et immunofixation urinaires: protéinurie de Bence Jones fréquemment positive mais exceptionnellement associée à la survenue de néphropathie
Chaines légères libres sériques (FLC)	Augmentation des FLC corrélée le plus souvent au pic IgM. Paramètre en évaluation Perspectives de suivi de la maladie résiduelle (en évaluation) si patient informatif
Viscosité plasmatique	Si disponible. Augmentation de la viscosité sanguine > 3cp : Indication de traitement par plasmaphérèse lors d'une suspicion de syndrome d'hyperviscosité
Beta 2 microglobuline	Facteur pronostique. A interpréter en l'absence d'insuffisance rénale
Bilan martial	Déficit fonctionnel en fer (saturation en fer diminuée/ ferritine normale ou élevée) Dosage du fer sérique. Si déficit en fer avéré chez les patients avec l'anémie comme seul critère de traitement : exploration étiologique à envisager surtout chez les sujets âgés (cancer du colon,..)
Autres	LDH (lactate déshydrogénase) Si bilan d'anémie : vitamine B12, folates, bilan rénal (créatinine,..), bilan thyroïdien, bilan hépatique, dosage d'érythropoïétine dans des cas particuliers

I.1.4 DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

L'existence d'un pic monoclonal de type IgM et d'une infiltration lymphoïde B peut être observée dans différentes hémopathies lymphoïdes chroniques associée ou non à une différenciation plasmocytaire (Tableau 4). Les principaux diagnostics différentiels de la Maladie de Waldenström restent toutefois les lymphomes de la zone marginale (MZL) de forme splénique ou nodale et la MGUS à IgM caractérisée par l'absence d'infiltration lymphoplasmocytaire dans la moelle osseuse à la BOM (6, 57, 141, 158, 307).

Un pic d'IgM élevé (> 20 g/l) ne constitue pas un argument nécessaire et suffisant pour poser le diagnostic de la MW (225). De même, un lymphome lymphoplasmocytaire sans pic monoclonal de type IgM ou sans atteinte de la moelle osseuse ne peut être classé en MW même si une fréquence élevée de mutation *MYD88L265P* peut être observée (141, 229). Un myélogramme associé si nécessaire à une biopsie ostéomédullaire est donc à réaliser devant toutes suspicions de MW (57, 286).

L'analyse cytologique et la caractérisation immunophénotypique des cellules tumorales sont des outils indispensables pour établir le diagnostic différentiel entre les autres hémopathies lymphoïdes chroniques B et la MW. La recherche de la mutation *MYD88L265P* a intégré le panel des analyses à prescrire pour poser un diagnostic de MW (57, 286). La cytogénétique conventionnelle, qui a bénéficié de l'utilisation des nouveaux stimulants et la FISH peuvent s'avérer utile dans la démarche de diagnostic différentiel (8, 40, 218). Une confrontation de la présentation clinique et des différents marqueurs biologiques est donc nécessaire au diagnostic différentiel de MW.

A. *Gammapathie monoclonale de type IgM (MGUS-IgM) :*

La présence d'une gammapathie monoclonale de type IgM (MGUS-IgM) peut être fréquemment identifiée plusieurs années avant le diagnostic de macroglobulinémie de Waldenström (18, 157, 158, 305). Chez les patients asymptomatiques, les MGUS à IgM sont donc un des principaux diagnostics différentiels de la MW à discuter (156). La mutation *MYD88L265P* est mise en évidence dans 20 à 54 % des cas de MGUS-IgM (162, 305, 334). Les patients qui présentent un pic IgM sans infiltrat médullaire (< 10 % de cellules clonales médullaires) sont classés dans les MGUS à IgM (6). Toutefois, une population clonotypique comparable à celle de la MW ainsi que des anomalies cytogénétiques telles que la délétion 6q peuvent être observées dès le stade MGUS-IgM (230, 231). La date de diagnostic de MW dépend donc souvent de la date de l'exploration médullaire décidée au regard du contexte clinique du patient. En tous cas, les MGUS-IgM sont des entités plus proches du groupe des lymphomes lymphoplasmocytaires auquel appartient la MW que du myélome multiple (286).

B. Lymphome de la zone marginale :

Les critères du diagnostic différentiel de la MW et des MZL ont longtemps été discutés dans la littérature (8, 28, 93). Dans les MZL de forme splénique, la splénomégalie, une lymphocytose sanguine et des pics monoclonaux IgM de valeurs plus faibles sont plus fréquemment observés (8, 303). Les profils d'infiltration tumorale à la BOM pourraient, dans certains cas, distinguer MZL et MW : l'infiltration de type sinusoidale est peu fréquente dans la MW (9).

Sur le plan immunophénotypique, les différences du profil d'expression d'IgM de surface, de l'intensité du CD25 et du CD22 ont été rapportées (230). Toutefois, aucune standardisation multicentrique ne permet actuellement d'appliquer une valeur seuil décisionnelle. Le CD25 est plus fortement exprimé dans les MW que dans la MZL (220). Le clone « MW » se distingue dans près de 90% des cas par l'absence CD10, CD11c et CD103 (26, 29, 230). L'expression de CD138 est plus fréquemment observée dans la MW que dans les MZL (60 % *versus* 18 % des MZL) (155). Le CD27 est fortement exprimé dans les MZL (230).

Le profil mutationnel permet en partie de distinguer MW et MZL. La mutation *MYD88L265P* est observée dans moins de 10% des cas des MZL et est souvent associée à la mise en évidence d'un pic IgM (93, 283, 293, 305, 321). D'autres mutations de *MYD88* sont décrites à très faible fréquence dans les MZL, variants qui ont été récemment rapportés dans des MW *MYD88L265P^{WT}* (68, 229). Des mutations de *Notch2* ont été mises en évidence dans environ 25% des cas les MZL (191, 238, 262). Les mutations de *KLF2*, détectées récemment dans 15 à 42% des MZL, sont décrites comme mutuellement exclusives de *MYD88* (68, 229, 262). Ces différentes mutations ont été observées dans les lymphocytoses B clonales « *marginal like* » (CBL-MZ) (43). Des variants somatiques de *MLL2* sont rapportées dans environ 15 % des lymphomes de la zone marginale dans les formes spléniques et environ dans un tiers des formes ganglionnaires (262, 283, 299). Des mutations de *PTPRD* ont été rapportées plus spécifiquement dans ce sous groupe (283).

Le caryotype peut contribuer au diagnostic différentiel MZL/MW. La trisomie 4 est principalement mise en évidence dans les MW (39, 218, 292). Les délétions 7q ainsi que les trisomies 3 ou 18 sont identifiées dans les MZL en particulier dans la forme splénique (4, 39, 218). L'association des anomalies cytogénétique est aussi importante à prendre en compte. Ainsi, la trisomie 18 est souvent associée à la trisomie 4 dans la MW et aux trisomies 3 ou 12 dans les MZL (39, 218).

Les réarrangements de la famille VH1-2 sont observés dans environ 40% des cas de MZL (4, 8, 41, 68). L'absence de mutation hypersomatique des gènes IgVH est rapportée dans 40 à 50% des cas (41, 292). Dans la maladie de Waldenström, l'analyse du statut mutationnel des gènes des IgVH a montré l'existence d'un répertoire biaisé avec une surreprésentation des réarrangements de la famille IgVH3 (2/3 des cas) et un pourcentage d'hypermuation somatique élevé (192, 235, 306).

A ce jour, l'algorithme décisionnel pour établir le diagnostic différentiel entre les MW et les MZL s'est précisé. Toutefois, le profil cytologique, immunophénotypique et génomique qui distingue les MZL des MW sans mutation *MYD88L265P* n'est pas clairement défini, une nouvelle entité reste donc à caractériser (57).

C. Autres syndromes lymphoprolifératifs :

D'autres hémopathies lymphoïdes chroniques B telles que les lymphomes du manteau peuvent présenter un pic monoclonal IgM en général de plus faible intensité que dans la MW (181, 245). Le diagnostic différentiel peut s'établir en confrontant la présentation clinique, les résultats des analyses cytologique, anatomopathologique et cytogénétique et la recherche de la mutation *MYD88L265P* (Tableau 4). L'association de 2 pathologies, même s'il s'agit d'un cas de figure rare, doit être éventuellement envisagée.

Des pics monoclonaux de type IgM peuvent être observés dans la LLC (138, 194, 251, 255). Les adénopathies sont plus fréquentes dans la LLC en particulier au stade B et C. Une lymphocytose est constamment observée dans la LLC à la différence de la MW. L'analyse cytologique des lymphocytes et le score de Matutes peuvent donc permettre de différencier ces 2 hémopathies. Une co-expression CD5/CD23 et un faible niveau d'expression des Ig de surface sont classiquement observés dans la LLC. Sur le plan cytogénétique, les délétions en 13q14 et des trisomies 12 sont principalement observées dans les LLC, les délétions 6q sont rares (23, 39, 255). La mutation *MYD88L265P* est présente dans < 5% des cas de LLC préférentiellement chez les sujets jeunes avec un statut mutationnel IgVH muté (23, 72, 161).

Le diagnostic différentiel avec les lymphocytoses monoclonales de signification indéterminée (MBL) peut en revanche s'avérer plus délicat à envisager au regard de la présence de population clonale circulante dans la MW (25, 43, 166, 334). Les mutations *MYD88L265P* peuvent être en effet identifiées en particulier dans les formes CD5- mais sont peu fréquentes (25, 43, 194).

Certains patients atteints de MW ont une présentation cytologique à prédominance plasmocytaire. Le myélome multiple à IgM est une entité rare qui se définit par la présence d'un infiltrat plasmocytaire dans la moelle osseuse. Sur le plan clinique, des lésions osseuses lytiques sont observées. L'insuffisance rénale est plus fréquente dans les MM que dans la MW (276). La coexpression du CD19 et du CD20 ainsi que l'expression d'une Ig membranaire à l'immunophénotypage doivent orienter vers une MW. Les MM à IgM présentent des translocations impliquant le locus 14q32 et en particulier la t(11;14)(q13;q32), absente dans la MW. La mutation *MYD88L265P* n'est pas décrite dans les myélomes à IgM (12, 13, 317, 334). Des amyloses peuvent compliquer l'évolution des MW. La mutation *MYD88L265P* est observée dans environ 75% des cas d'amylose à IgM qui représentent moins de 15% des amyloses (59).

La cryoglobulinémie de type 1 et la maladie des agglutinines froides peuvent constituer aussi des diagnostics différentiels de la MW. La présentation clinique, les examens cytologiques, anatomopathologiques et moléculaires (réarrangement IgVH4-34,..) permettent d'établir le diagnostic différentiel. La mutation *MYD88L265P* n'est pas observée dans ces différentes pathologies (253, 275, 284).

Tableau 4 : Principaux diagnostics différentiels de la maladie de Waldenström (adapté de G Fouquet et S Poulain *et al*) (89)

Entité	Histologie/ Cytologie	Immunophénotype	Présentation biologique et génomique
Maladie de Waldenström	≥10 % Infiltration par de petits lymphocytes, lymphoplasmocytes et plasmocytes (<i>continuum</i> lymphoplasmocytaire) Caractéristique mais pas pathognomonique : mastocytes dans la MO Infiltration paratrabéculaire, parfois diffus Absence des centres prolifératifs et de zone de différenciation de type zone marginale	• Expression des antigènes pan B (CD19, CD20, CD22, CD79a). • Absence de coexpression CD5/CD23. • Expression variable du CD38, CD138, CD27. • Forte expression des Ig de membrane • La majorité des cas expriment une IgM, parfois une IgG. • CD10 peu fréquent • CD103 et cycline D1 ne sont pas exprimés	• Pic monoclonal de type IgM quel que soit son taux • Mutation MYD88L265P: 80-90% des cas • Mutation de CXCR4: 30% • Absence d'anomalies cytogénétique spécifiques. Incidence élevée de délétion 6q (30-50%) et de trisomie 4 (8- 20%) • Translocations rares impliquant le locus 14q32 • Statut mutationnel IgVH hypermuté (90% des cas) : surreprésentation de la famille VH3
Ig M MGUS	<10% B infiltration dans la moelle osseuse	• Cellules clonales détectables	• Pic monoclonal de type IgM quel que soit son taux • Mutation MYD88 L265P: 40-50% des cas • Mutation CXCR4 : 20% des cas (CXCR4S338X)
Lymphome de la Zone Marginale	Lymphocytes de plus grande taille avec cytoplasme parfois abondant modérément basophile. Infiltrat lymphocytaire interstitiel et nodulaire à la BOM. Atteinte diffuse peu fréquente. Infiltrat lymphocytaire intrasinusal à rechercher	• Expression de marqueurs B : CD19, CD20 • Expression forte des IgG de surface et du CD22, CD27 • CD10 le plus souvent négatif, • CD23 faible ou négatif (réseau de cellules folliculaires dendritiques soulignant les nodules lymphoïdes intertrabéculaires)	• Pic monoclonal (<30% des cas) (parfois IgM) • Mutation MYD88L265P: < 10% des cas • Autres mutations de MYD88 possibles • Mutation KLF2 : 15-42% / Mutation Notch2 : 25% des cas • Anomalies chromosomique : délétion 7q (environ 40%) ; trisomie 3, 12 ou 18, délétion 11q. • Cryoglobuline mixte +/- infection par l'hépatite C. • Réarrangement IgVH 1-2 fréquent (environ 40% des cas)
Leucémie Lymphoïde chronique/ Lymphome lymphocytaire	Petits lymphocytes matures. Cytoplasme modérément basophile. Absence de nucléoles et de villosités cytoplasmiques Présence de noyaux nus au frottis sanguin. Composant prolymphocytaire (<55%) dans forme mixte	• Score de Matutes : 4-5 • Coexpression CD5/CD23 • Expression diminuée du CD20 et des IgG de surface, CD43 fort	• Mutation MYD88L265P, autres mutations de MYD88 : <5% des cas • Délétion l3q (50%), Délétion 11q, Délétion 17p, Trisomie 12. Délétion 6q peu fréquentes • t(11 ;14) doit être recherchée dans les leucémie à prolymphocytes ou à composante prolymphocytaire.

Entité	Histologie/ Cytologie	Immunophénotype	Présentation biologique et génomique
Lymphome Folliculaire	Infiltration de type nodulaire du centre germinatif (centrocytes avec noyaux encochés et ou centroblastes). Faible fréquence des infiltrations du sang périphérique.	- Score de Matutes < 2 - Typiquement forte expression des Ig de surface, CD10, HLA DR, - Antigènes pan B (CD19, CD20, CD79a), CD21, et IgM de surface, IgG, or IgA - Hyperexpression de Bcl2	- t (14 ; 18) (réarrangement bcl2 Jh) (environ 90% des cas) Mutation MYD88 L265P : <5% des cas (driver de transformation en DLBCL)
Myélome à IgM	Infiltration de la moelle osseuse de plus de 10% par des plasmocytes	- Absence d'expression des Ig de surface. - Forte expression du CD138 et du CD38 - Faible fréquence d'expression du CD19 ou du CD20, - Absence de coexpression CD19/CD20	- Pic monoclonal de type IgM Absence de mutation MYD88L265P - t(11 ;14) : 2/3 cas
Myélome multiple	Infiltration de la moelle osseuse par >10% de plasmocytes (morphologie normale à anormales avec anomalies nucléaires) Aspect lymphoplasmocytaire de certains myélome à t (11 ; 14)	- Absence d'expression des Ig de surface - Expression du CD138 et CD38 - Rare expression du CD19 ou du CD20 - Expression du CD56 dans environ 70% des cas	- Absence d'IgM Absence de mutation MYD88L265P - Mutation NRAS et K RAS : 30% - Cytogénétique le plus souvent anormale (absence d'anomalies spécifiques). - Translocations impliquant le locus 14q32 est fréquente.
Amylose à IgM	Augmentation modérée de plasmocytes de morphologie normale Caractérisation d'une amylose	Marqueurs plasmocytaires	- Pic IgM quel que soit le taux Mutation MYD88L265P : 75% des cas - Fréquence élevée de t(11,14) - Association possible à une MW
Lymphome du manteau	Lymphocytes monomorphes (petits à taille moyenne) avec noyau irrégulier et parfois un nucléole. Forme blastoïde possible Modes d'infiltration variés souvent mixte	- Score de Matutes < 3. CD5+ /CD23- - Coexpression de l'IgM et IgD de surface - Hyperexpression de la cycline D1 / Expression de SOX11 +	Mutation MYD88 L265P : <5% des cas - t (11;14) - hyperexpression de la cycline D1 - Caryotype le plus souvent complexe
Lymphome lymphoplasmocytaire	Infiltration lymphoplasmocytaire sans infiltration de la moelle osseuse. Infiltration de la moelle osseuse sans IgM	Marqueurs lymphoïdes B	- Ig M possible. - Absence de composant monoclonale ou pic IgG g ou IgA Présence de la mutation MYD88L265P (43% des cas non IgM)

I.1.5 OPTIONS THERAPEUTIQUES

A. Critères de traitements :

Les critères de traitement ont été définis initialement par le *Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia* et comprennent à la fois des critères cliniques et biologiques (79, 159) (Tableau 5).

Plus de 25 % des patients sont asymptomatiques au diagnostic et la moitié de ces patients ne vont pas nécessiter de traitement dans les 3 ans. Environ 10% des patients ne nécessitera pas de prise en charge thérapeutique dans les 10 ans qui suivent le diagnostic (158, 159). Pour le groupe des MW asymptomatiques, une attitude de type *Watch and Wait* est recommandée : surveillance clinico-biologique et abstention thérapeutique. Un suivi peut être proposé au patient tous les 3 à 6 mois la première année pour confirmer le caractère indolente de l'hémopathie (79).

Tableau 5 : Critères d'initiation de traitement dans la Maladie de Waldenström (79, 159)

Critères cliniques de traitement
Fièvres récurrentes, sueurs nocturnes, perte de poids, asthénie Syndrome d'hyperviscosité Adénopathie symptomatique ou volumineuse (≥ 5 cm de diamètre) Hépatomégalie symptomatique et ou splénomégalie Organomégalie symptomatique et /ou infiltration tissulaire (localisation extramédullaire) Neuropathie périphérique liée à la MW
Critères biologiques
Cryoglobuline symptomatique Anémie associée à des agglutinines froides Anémie autoimmune et /ou thrombopénie Néphropathie liée à la MW Amylose associée à un MW Anémie avec un taux d'hémoglobine ≤ 10 g/dL Thrombopénie $< 100 \times 10^9/L$

B. Principes de traitement :

La MW est une hémopathie rare. Aujourd'hui, très peu d'études randomisées et ou de phase III ont été publiées (47, 165, 263). L'évaluation des nouveaux traitements est donc souvent réalisée dans de petites séries de patients. De ce fait, il n'existe donc pas de réel consensus en terme de traitement de la maladie même si des recommandations internationales issues de différents groupes de travail d'experts ont été émises (79, 303, 165B). Comme toutes hémopathies lymphoïdes chroniques, différents paramètres sont à prendre en considération lors du choix de la stratégie thérapeutique : âge, comorbidité, présentation clinique (syndrome d'hyperviscosité nécessitant une réponse rapide,...), importance du pic monoclonal et des cytopénies avant traitement,...

Trois grandes classes thérapeutiques sont communément utilisées en première ligne, en rechute et en situation d'échec : les alkylants, les analogues nucléosidiques et les anticorps monoclonaux anti-CD20 (47, 79, 303). L'immunochimiothérapie avec le rituximab est désormais recommandée en première ligne pour la majorité des patients (Tableau 6).

Les combinaisons à base de fludarabine ne sont plus préconisées en première ligne en particulier chez les sujets jeunes mais demeurent une option intéressante chez les patients en rechute ou réfractaire avec un bon état général (47, 165). Pour les patients candidats à une monothérapie, la forme orale de la fludarabine, si elle est disponible, est à préférer au chlorambucil (80).

Le DRC (dexaméthasone, rituximab (R) et cyclophosphamide), polychimiothérapie sans analogues nucléosidiques, reste le traitement de choix dans la MW (47, 77). Les combinaisons telles que rituximab-cyclophosphamide et R CHOP (rituximab-cyclophosphamide-doxorubicine-vincristine-prednisone) ne sont plus recommandées en première ligne. L'association R bendamustine constitue une nouvelle option thérapeutique en particulier chez les patients à forte masse tumorale (263, 294). Une autre stratégie thérapeutique consiste à utiliser la combinaison d'un inhibiteur du protéasome comme le bortézomib avec le rituximab chez les patients de haut risque ou chez les patients plus jeunes chez qui les traitements par agents alkylants ne sont pas à prioriser. Des combinaisons avec le bortézomib comme le BDR (bortézomib-dexaméthasone-rituximab) ont montré des résultats intéressants (62, 63, 78, 297). La survenue de neuropathies constitue toutefois l'un des effets secondaires les plus fréquents de ce type d'approche thérapeutique. Le carfimizomib est un inhibiteur du protéasome de deuxième génération. Il a été récemment associé au rituximab et à la dexaméthasone (CaRD) dans la MW principalement en première ligne de traitement et a montré un taux de réponse élevé sans être associé à des toxicités importantes en particulier en termes de neuropathies (301).

L'instauration de plasmaphérèse est à envisager chez les patients symptomatiques présentant un syndrome d'hyperviscosité et/ou de forme sévère de syndrome des agglutinines froides ou de cryoglobuline (303). En cas de pic monoclonal élevé, (IgM > 4g/dl), l'intérêt d'une plasmaphérèse avant instauration du rituximab peut être discuté pour éviter un syndrome de "flare" que l'on doit différencier d'un état réfractaire au traitement ou d'une progression de la maladie (47, 57, 78, 79, 297).

Le traitement avec le bortézomib permet une réduction rapide du taux de l'IgM (78, 79). Une induction par cet inhibiteur du protéasome en monothérapie peut être proposée avant l'administration du rituximab comme dans le schéma BDR, indiqué dans les syndromes d'hyperviscosité.

C. Options thérapeutiques ciblées émergentes

Dans la MW, une activation constitutive de nombreuses voies de signalisation parmi lesquelles figurent PKC/NFκB et PI3K/AKT/mTOR, a été mise en évidence (168, 202, 170, 258, 259). L'ensemble de ces voies peut être ciblé par différents inhibiteurs pharmacologiques dont l'intérêt a été évalué dans des essais de phase I/II (80).

Différents inhibiteurs spécifiques de la voie PI3K ont été évalués dans la MW : la périfosine (inhibiteur d'AKT) qui a montré un taux de réponse assez faible dans la MW, l'évérolimus (inhibiteur de mTOR) et l'enzastaurin (inhibiteur de PKC), l'idelalisib (NCT0224220-45, NCT02439138) (80, 100, 102, 103),....

La famille des inhibiteurs de mTOR comprend les agents de première génération comme la rapamycine et son analogue, l'évérolimus (100). Un essai de phase II évaluant l'intérêt de l'évérolimus en monothérapie dans les MW en rechute ou réfractaires a montré un profil de toxicité modéré et un taux de réponse d'environ 70% (80, 100). Une combinaison évérolimus avec bortézomib et rituximab a été évaluée (103). Les inhibiteurs de mTOR de seconde génération ciblent le site de liaison à l'ATP pour inhiber à la fois l'activité de mTORC1 et mTORC2 (258). Le développement de certains agents ciblant à la fois les voies AKT et mTOR comme le NVPBEZ235 pourrait être intéressant dans certains groupes de MW (80, 258).

D'autres classes thérapeutiques sont également actuellement en cours d'évaluation dans le cadre d'essais pré cliniques ou cliniques : inhibiteurs des histones acétylases (panobinostat,...), immunomodulateurs (lénalinomide...), inhibiteurs de Bcl2 (ABT-199,...) (52, 80, 88, 303).

Toutefois, un cap décisif a été franchi dans la prise en charge de la MW par la publication des résultats obtenus par l'essai thérapeutique évaluant l'intérêt de l'ibrutinib (PCI-32765), un inhibiteur irréversible de la Bruton's kinase (BTK) (301B). L'ibrutinib se lie au résidu cystéine 481 situé au niveau du site actif de BTK : l'enzyme est alors inactivée, les voies de signalisations en aval de BTK régulées négativement (240, 323, 327). L'étude menée par S Treon a inclus 63 patients ayant reçus en moyenne 2 lignes de traitement. Une réduction rapide du pic monoclonal IgM est observée dès 1 mois. Un profil de tolérance acceptable et une toxicité modérée sont rapportés. Toutefois, des risques hémorragiques et cardiovasculaires (fibrillation) doivent être pris en considération. Le taux de réponse globale est de 90,5%. La survie globale est estimée à 95,2% à 24 mois (301B). Aucune réponse complète n'a été cependant observée après un suivi d'environ 19 mois au moment de la publication de l'étude. Dans le syndrome de Bing Neel, l'utilisation de l'ibrutinib a montré des résultats intéressants (195B). L'ibrutinib a été le premier agent pharmacologique dans la maladie de Waldenström à avoir

obtenu une autorisation par le FDA (*Fund and drug administration*) puis par EMA (*European Medicine Agency*). L'évaluation de l'intérêt de l'ibrutinib en première ligne et en monothérapie dans la MW a débuté (NCT02604511). Cette stratégie « *chemo free* » ouvre la perspective des nouvelles thérapies ciblées dans la MW. D'autres inhibiteurs de BTK sont déjà en cours d'évaluation protocolaire ou préclinique : l'ACP196 (NCT02180724), le CC-292, le RN486, le LFM-A13, le GDC-0834, le dasatinib ou l'ONO-4059 (80, 303, 324). Des inhibiteurs pharmacologiques plus spécifiques de MYD88 (IMO-8400/ NTC02092909) ou ciblant IRAK sont aussi en cours de développement pré cliniques (179, 184, 185).

Tableau 6 : Schémas thérapeutiques selon les recommandations de l'IWM7 (adapté de 47, 80, 303)	
Patients au diagnostic	Options thérapeutiques
Patients avec des cytopénies ou organomégalias	Combinaison avec du rituximab : DRC (faible toxicité) ou bendamustine + rituximab (réponse rapide), Bortézomib/rituximab +/- dexaméthasone (réponse rapide, neurotoxicité, peu de toxicité hématologique). Inclusion protocolaire
Patients avec syndrome d'hyperviscosité, cryoglobuline ou agglutinines froides :	Echange plasmatique si urgence Induction par du bortézomib suivi d'une combinaison bortézomib/rituximab +/- dexaméthasone Ou bendamustine/rituximab (réponse rapide, fréquence du syndrome <i>flare</i> peu documenté) Alternative chez sujets de préférence âgés : Fludarabine/rituximab +/- cyclophosphamide (toxicité hématopoïétique, toxicité à long terme)
Patients avec neuropathie lié à IgM	Abstention thérapeutique si signes cliniques discrets et non invalidants Première option : rituximab en monothérapie (si atteinte clinique modérée) ou DRC (faible toxicité, risque de syndrome de flare) Alternative : fludarabine /rituximab (plus toxique, patients avec neuropathies invalidantes) ou bendamustine/rituximab (peu de données disponibles en ce qui concerne les neuropathies)
Patients jeunes éligibles à l'autogreffe de moelle osseuse	DRC ou bortézomib/ rituximab +/- dexaméthasone. Alternative : bendamustine/ rituximab (impact faible probable sur le recueil de cellules souches)
Patients âgés avec un mauvais performance status	DRC (faible toxicité) ou fludarabine orale Alternative : rituximab en monothérapie ou chloraminophène
Patients âgés non éligible pour une administration parentérale	Fludarabine par voie orale ou chloraminophène
Patients en rechute ou réfractaire	
Options thérapeutiques de première ligne en prenant en considération différents paramètres	Reprendre la même ligne de traitement si une réponse d'au moins 24 mois a été observée Proposition d'ibrutinib. Ne pas reproposer l'ibrutinib en cas de progression en première ligne avec cette molécule.
	Pour les patients en rémission < 12 -24 mois ou avec une hémopathie progressive ou réfractaire à la première ligne : changer de classe thérapeutique (en monothérapie ou en combinaison). Si intolérance au rituxima, proposition de l'ofatumumab.
	Eviter les agents à toxicité hématologique importantes pour les patients potentiellement candidats à l'autogreffe de moelle osseuse
	Autogreffe de moelle osseuse potentiellement intéressante quand moins de 3 lignes de traitement sont été administrées
	Inclusion dans des protocoles cliniques innovants (everolimus,...)

D. Critères de réponse au traitement :

Des critères de réponse à la chimiothérapie ont été définis dans la MW lors de différents *workshop* internationaux et reposent essentiellement sur l'évolution de la réponse clinique et du pic monoclonal (227). Les principaux profils sont ainsi définis comme suit :

- Réponse complète : disparition de tous les symptômes cliniques (une disparition des organomégalies, des signes neurologiques,...), normalisation de l'électrophorèse des protéines sériques avec disparition totale de l'IgM monoclonale par l'immunofixation, aspect cytologique normal de la BOM
- Très bonne réponse partielle : diminution de 90 % du pic monoclonal associée une disparition des signes cliniques
- Réponse partielle : absence de nouveaux signes cliniques et réduction du pic monoclonal de 25 à 50%.

Toutefois, des discordances entre la quantification de l'IgM et la masse tumorale résiduelle peuvent être observées dans certains cas. L'intérêt d'une tomoscintigraphie par émission de positons peut être discuté en cas de présentation extramédullaire de la MW ou de suspicion de transformation en lymphome à grandes cellules B chez les patients réfractaires (19, 303). Les traitements par bortézomib, évérolimus ou ibrutinib peuvent diminuer l'envahissement tumoral de la MO en l'absence d'une réduction importante du pic IgM (78, 99). L'introduction de nouveaux agents dans l'arsenal thérapeutique de la MW va donc conduire à l'évaluation de nouveaux marqueurs de maladie résiduelle ou à redéfinir les critères de réponses dans la MW (89).

L'intérêt des chaînes légères libres (FLCs) est en cours d'analyse dans des études ancillaires des protocoles thérapeutiques (169, 173). Une diminution plus précoce de ce marqueur par rapport à la quantification de l'IgM pourrait être observée (173). D'autres marqueurs sériques tels que le CD27 soluble semblent intéressants au regard de leur corrélation à la masse tumorale (122).

L'intérêt du suivi de la maladie résiduelle en cytométrie de flux en cours de traitement a été également étudié. La modification du ratio clone tumoral/ population lymphocytaire B normale est corrélée à la réponse clinique et biochimique (95, 230). La mutation *MYD88L265P* peut être considérée comme un marqueur moléculaire de la masse tumorale. A ce jour, l'évaluation de la réponse par la quantification de la mutation *MYD88L265P* par PCR en temps réel n'a été rapportée que dans quelques cas (138, 249, 334). Toutefois, l'ensemble de ces nouveaux biomarqueurs reste à valider dans le cadre d'études ancillaires associées aux protocoles thérapeutiques (218, 221).

I.1.6 FACTEURS PRONOSTIQUES

La maladie de Waldenström est une hémopathie lymphoïde B hétérogène sur le plan clinique mais aussi en termes d'évolution. La fréquence des diagnostics de MGUS de type IgM augmente en partie en raison de la banalisation de la prescription d'électrophorèse des protéines sériques ou de bilans systématiques (18, 158).

Les MW de forme asymptomatique (ASW) peuvent rester indolentes pendant plusieurs années (156). Les équipes de la Mayo Clinic ont proposé comme critère de diagnostic la mise en évidence de plus de 10% de cellules clonales lymphoplasmocytaires dans la moelle osseuse à la biopsie osteomédullaire ou un pic monoclonal >3 g/dL et l'absence de lésions organiques (6). La probabilité de progression des MW asymptomatiques est respectivement de 6%, 39%, 59% et 68% à 1, 3, 5, et 10 ans et 75% à 15 ans (156). A 100 mois de suivi, 21% des MW asymptomatiques ont progressé vers une forme symptomatique dans la cohorte du Southwest Oncology Group (76). A ce jour, aucune étude n'a démontré l'intérêt d'un traitement au diagnostic à une phase asymptomatique de la MW. Selon une étude américaine, qui a réalisé le suivi d'une cohorte de 232 patients atteints d'une MW asymptomatique, un taux d'hémoglobine, l'importance de l'infiltration médullaire ou du pic IgM et un taux élevé de $\beta 2$ microglobuline sont des facteurs de risque d'évolution vers une phase symptomatique nécessitant l'initiation d'un traitement (76, 156, 206, 303).

A l'inverse, chez les patients considérés comme symptomatiques (SW), au diagnostic ou après une phase asymptomatique, un traitement par chimiothérapie est nécessaire selon les critères d'initiation précédemment définis (159, 303). La fréquence des rechutes après traitement reste toutefois élevée (55, 56, 79, 206). Les principaux facteurs de mauvais pronostic sont : l'âge supérieur à 65 ans, l'anémie, l'hypoalbuminémie, une $\beta 2$ -microglobuline élevée (> 3 mg/l), les leucopénies et les thrombocytopénies (206). D'autres facteurs ont été décrits : les bicytopénies, les pancytopénies, l'existence d'une hépatomégalie ou d'une splénomégalie, la présence d'une cryoglobuline, la présence de symptômes constitutionnels, le sexe masculin, l'hyperviscosité, une CRP supérieure à 1 mg/l (206). La valeur pronostique de l'existence de localisation extramedullaire chez les patients est discutée (20, 57). Toutefois, la survenue d'une néphropathie en relation avec la MW (infiltration tumorale, amylose,...) serait de pronostic péjoratif (311B). La transformation en lymphome de haut grade de type DLBCL est associée à survie médiane de l'ordre de 3 ans (57B).

L'IPSSWM (*International Prognostic Scoring System for Waldenström macroglobulinemia*) est un score pronostique établi dans le groupe des patients symptomatiques pour évaluer la survie du patient après une première ligne de traitement (205). Ce score est bâti sur l'utilisation de cinq paramètres : l'âge (> 65 ans), le taux d'hémoglobine (< 11,5 g/dl), des plaquettes (< 100 G/l), une $\beta 2$ -microglobuline (> 3 mg/l) et la valeur du pic de l'Ig M (> 70 g/l). Trois groupes de risques ont été ainsi identifiés avec des pourcentages de survie à 5 ans de 87, 68 et 36 % respectivement (205) (Table

7). Mis à part le critère de l'âge du patient, les autres facteurs de mauvais pronostic reflètent l'importance de la masse tumorale. Toutefois, l'interprétation du taux d'hémoglobine doit prendre en compte l'éventuelle hémodilution associée à un taux élevé du composant monoclonal IgM et l'exclusion d'autres étiologies de l'anémie établie (carence,...) (57, 226, 303). Le score IPSSWM est aussi informatif en cas de rechute après traitement ou de maladie progressive. L'intérêt de ce score a été aussi validé lors de l'instauration des associations chimiothérapies / anti CD20 (121, 139, 140). Plusieurs études ont mis en évidence l'intérêt des LDH (Lactate Déshydrogénase) dont la valeur pronostique péjorative serait observée principalement au sein des patients à haut risque de l'IPSSWM (139). Un taux élevé de facteur Willebrand est considéré comme un facteur de pronostic péjoratif en terme de survie après une première ligne de traitement, indépendamment de l'IPSSWM (120).

Tableau 7 : Index pronostique international de la Maladie de Waldenström (IPSSWM) nécessitant la mise en route d'un traitement de première ligne (205)

	Nombre de facteur de risque	Pourcentage de patient	Médiane de survie (mois)
Risque Faible	0 ou 1 (sauf l'âge)	27	142,5
Risque Intermédiaire	Age ou 2	38	98,6
Risque Élevé	≥ 3	35	43,5

La valeur pronostique clinique des chaînes légères libres ou *Free Light Chain* (FLC) a été étudiée (134, 173). Le taux des FLC est significativement plus élevé dans le groupe des patients symptomatiques et des patients avec des facteurs de mauvais pronostic (anémie, hypoalbuminémie, β -2 microglobuline élevée,...) (134, 173). A ce jour, les FLC ne constituent toutefois pas un facteur pronostique stratifiant les patients atteints de MW.

Aujourd'hui, l'impact pronostique clinique d'anomalies génomiques ou chromosomiques évaluées en cytogénétique conventionnelle ou en FISH n'est pas clairement défini (218, 221). La présence d'une délétion 17p a été associée à un délai de progression plus court (218). Une association entre la trisomie 4 et un taux de β 2 élevé est rapportée (218). La valeur pronostique de la délétion 6q demeure discutée (218, 221). La diversité des méthodes d'exploration des délétions 6q pourrait expliquer ces discordances (221). L'intérêt pronostique de ces marqueurs reste à réévaluer à l'ère de la chimioimmunothérapie et des thérapeutiques ciblées.

La valeur pronostique de différents biomarqueurs moléculaires a été évaluée. L'absence de mutation *MYD88L265P* a été récemment associée à un pronostic péjoratif dans une série de 175 patients (300). Certains polymorphismes génétiques ont été associés à une valeur pronostique clinique en terme de survie globale après traitement : *IL6* (-174GC), *SDF1* (-801GA), *Fc γ RIIa* (131RH) (241,

242, 243). L'introduction d'une immunothérapie par le rituximab a modifié le pronostic des patients surtout après 2000 (55, 56). Le génotype des Fcγ Récepteurs RIII (V158F) a été décrit comme un facteur pronostique de réponse à un traitement par anti CD20 (298).

Le diagnostic des MW concerne une population plutôt âgée où les modalités de prise en charge thérapeutiques ont toutefois évolué. Cependant, les décès pour une cause indépendante à la MW, même si cela est parfois difficile à évaluer, doivent être discutés dans le cadre des analyses statistiques (140, 303). D'autre part, des complications à long terme ont été observées dans la maladie de Waldenström : transformation en lymphome de haut grade, survenue de syndromes myélodysplasiques ou de leucémie aigüe, apparition de tumeur solide (172, 308). Le risque de cancer secondaire est en effet plus élevé dans la MW que dans la population générale (308). Les incidences cumulées des cancers solides et des hémopathies malignes secondaires ont été ainsi estimées à 8 et 17 % à 15 ans. Le type de chimiothérapie administrée est sans doute à prendre en compte dans cette évaluation (172).

I.2 PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MACROGLOBULINEMIE DE WALDENSTRÖM

Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MW est indispensable pour optimiser les nouvelles stratégies thérapeutiques.

Cinq axes principaux de recherche sont étudiés :

- L'apport du séquençage complet du génome : Identification des mutations *MYD88 L265P* et *CXCR4*
- L'exploration des signatures génomiques et protéique de la MW par l'analyse transcriptionnelle, de la régulation épigénétique et du protéome
- L'origine de la cellule tumorale
- La MGUS-IgM, un stade « pré MW »
- L'interface fonctionnelle entre le lymphoplasmodocyte et son microenvironnement.

I.2.1 APPORT DU SEQUENÇAGE COMPLET DU GENOME DANS LA MW : IDENTIFICATION DE LA MUTATION *MYD88L265P*

L'utilisation de différentes approches pan génomiques a permis de mieux caractériser la MW. La première étude de séquençage complet du génome dans la MW menée par l'équipe de S. Treon a inclus 30 patients atteints de MW, l'ADN constitutionnel était disponible dans 10 cas et a permis la description du panorama mutationnel de la MW (299).

Cette étude a permis de franchir un pas décisif dans la compréhension de la MW. En effet, la présence d'une mutation somatique du gène *MYD88* (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) résultant de la substitution d'une leucine par une proline (L265P) a été identifiée dans 90 % des cas de MW (299), mutation qui est rapidement devenue un outil diagnostique et un élément essentiel dans la pathogénèse de la MW (57).

A. Identification de la mutation *MYD88L265P* dans la MW

a) Présentation de la protéine adaptatrice *MYD88* :

Localisé en 3p22.2, le gène *MYD88* code pour une protéine adaptatrice impliquée dans la réponse de la voie des *Toll-like receptor* (TLR), de l'IL-18 et de l'IL-1 (136, 137, 315). Les membres de la superfamille des TLR participent à la réponse immunitaire innée. A ce jour, 10 TLR ont été identifiés

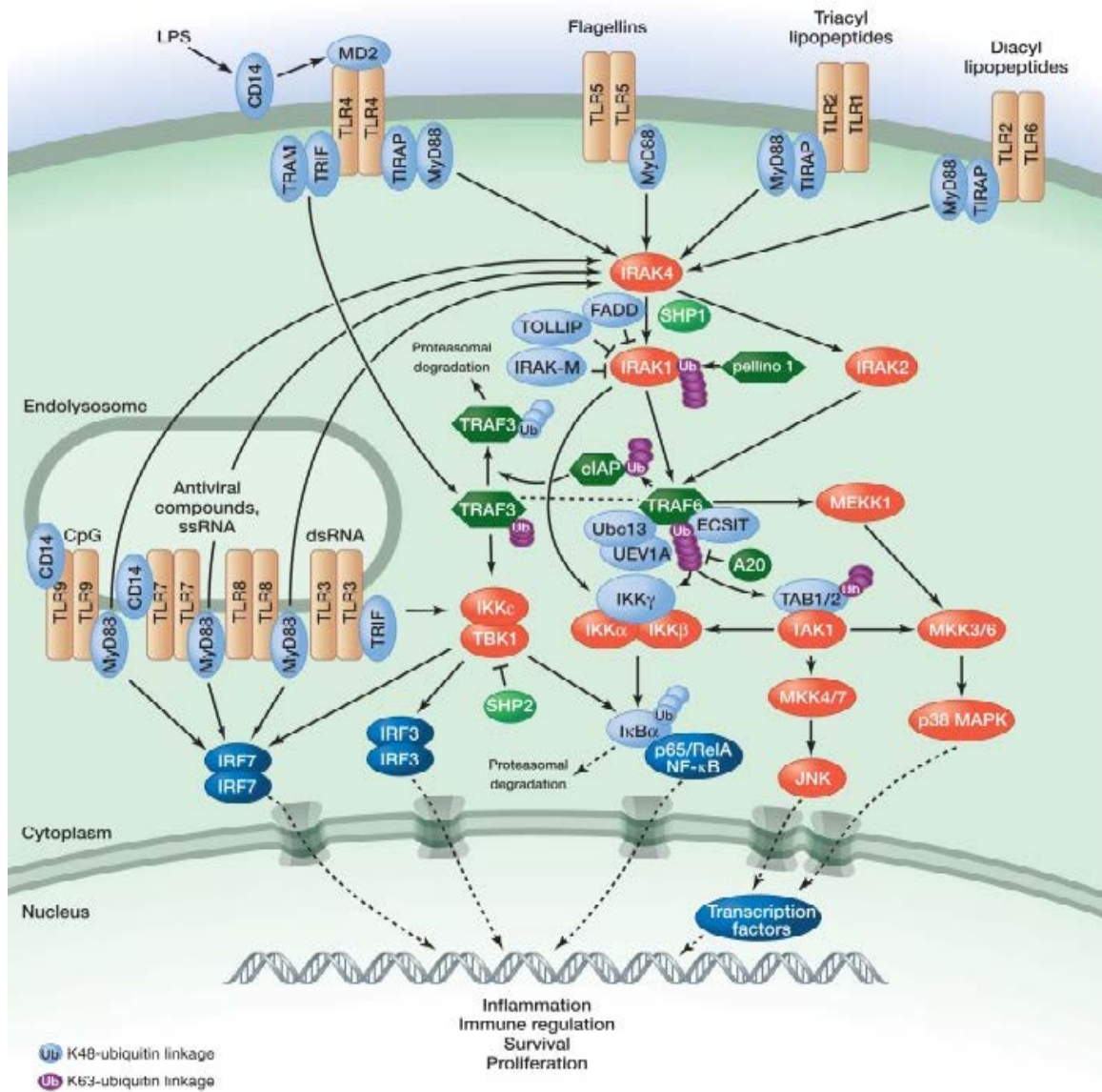
chez l'homme, chacun ayant une spécificité de ligand comme les lipopolysaccharides pour les TLR4 ou l'ADN bactérien pour les TLR9 (31). Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I qui comprennent un domaine extracellulaire participant à la reconnaissance des pathogènes, une région transmembranaire et un domaine TIR (Toll-IL-1 récepteur) intracellulaire qui contribue à l'activation de différentes voies de signalisation par l'engagement de 5 protéines dites adaptatrices parmi lesquelles figurent MYD88. MYD88 peut être recrutée par tous les TLR sauf le TLR3 (Figure 3).

Après activation du TLR ou du récepteur à l'IL-1, la transduction du signal intracellulaire va conduire au recrutement de la protéine MYD88. Après dimérisation, MYD88 induit la phosphorylation d'IRAK4 et IRAK1/2 et la libération de TRAF6. TRAF6 va conduire à la phosphorylation de I κ B kinase (IKK) qui phosphorylera à son tour I κ B entraînant la décomplexation de NF κ B. Différents signaux de survie sont alors induits qui conduisent, *in fine*, à l'activation d'une série de cascades de signalisations intracellulaires et de facteurs de transcription parmi lesquels figurent NF κ B (11, 182, 214, 315).

La structure de MYD88 comprend un domaine DD (*death domain*), un domaine intermédiaire de liaison (ID) et le domaine TIR en C terminal. Le domaine DD contribue à l'oligomérisation de MYD88 et à la formation d'un complexe multimérique avec les sérine-thréonine kinases IRAK1-IRAK4. Ce complexe participe à la propagation du signal et conduit à l'activation d'une cascade de signalisation et de facteurs de transcription comme NF κ B et AP1 (*activator protein 1*). Le domaine ID est une petite région impliquée dans l'interaction de MYD88 et d'IRAK4 avec le domaine DD. Après liaison des récepteurs (IL-1R ou TLR4) avec leur ligand, le domaine TIR active MYD88 : c'est donc un domaine essentiel à la transduction du signal (136, 137, 184, 185).

La voie des TLR joue un rôle crucial dans la réponse immunitaire des lymphocytes B indépendante du BCR (182). Les infections à bactéries pyogènes associées à un déficit de MYD88 constituent une forme particulière de déficit immunitaire primitif caractérisée par l'augmentation de la susceptibilité aux infections à bactéries pyogènes (pneumocoques, staphylocoques, pseudomonas) (OMIM612260). Des mutations autosomiques récessives de *MYD88* ont été identifiées : *MYD88R196C*, *MYD88C93P*, *MYD88E52del*,....(236, 310, 311). Les patients atteints par ce syndrome présentent une lymphopoïèse B normale et une réponse à l'immunisation normale, ce qui suggère que MYD88 n'est pas indispensable à la différenciation lymphocytaire B. En revanche, une accumulation de cellules autoréactives est observée chez ces sujets indiquant que la voie induite par MYD88 est impliquée dans le processus de sélection du répertoire B (214, 236, 310, 310).

Figure 3 : Place de MYD88 dans les voies de signalisation intracellulaire médiées par les TLRs (182)



b) Caractérisation fonctionnelle de *MYD88L265P*

1. Etude fonctionnelle dans les hémopathies lymphoïdes B

La caractérisation fonctionnelle de la mutation *MYD88L265P* a été réalisée dans le modèle des DLBCL (217). En effet, la mutation *MYD88L265P* a été initialement identifiée dans environ 30 % des lymphomes à grandes cellules B de type ABC (217). Une fréquence plus élevée de *MYD88L265P*, de l'ordre de 60 à 80%, est observée dans les DLBCL à localisation extraganglionnaire tels que les lymphomes primitifs du système nerveux central ou testiculaires, les lymphomes intra-oculaires, les lymphomes *leg-type*... (35, 149, 250).

Une stratégie par *RNA inhibition* a en effet montré que la survie des DLBCL de type ABC dépendait de MYD88 et des kinases IRAK1/2 composants essentiels de la voie de signalisation des TLR. L'activation et la dimérisation des TLR induit une variation conformationnelle dans le domaine intra-cytoplasmique TIR, conduisant au recrutement de MYD88 (137, 217). L'activation constitutive de la voie médiée par MYD88 contribue à l'activation de NFκB, qui, en concert avec l'activation des MAPK, induit la transcription de cytokines parmi lesquelles figurent l'IL6 et l'IL10. Ces cytokines se lient à leurs récepteurs et activent, sur un mode autocrine, les kinases de la famille de JAK pour phosphoryler le facteur de transcription STAT3. D'autre part, MYD88, dans les DLBCL de type ABC, induit la sécrétion de l'interféron β. Ce dernier exerce potentiellement une activité immunosuppressive ce qui favorisait l'échappement des cellules tumorales à la surveillance par le système immunitaire (217).

Une expression ectopique de l'isoforme mutée *L265P* de *MYD88* entraîne une augmentation de l'activité de NFκB dans des lignées DLBCL de type GC. En revanche, seule la forme mutée *MYD88L265P* permet l'échappement des cellules à la toxicité induite par le silencing de *MYD88* ce qui suggère la dépendance des lignées cellulaires à la fonction oncogénique de la mutation *MYD88L265P* (217).

D'autres mutations de *MYD88* sont observées dans environ 10% des cas de DLBCL de type ABC et peuvent être mise en évidence dans les DLBCL de type GC (34, 35, 183). Certains de ces variants (*S243N* et *M232T* par exemple) ont été caractérisés sur le plan fonctionnel et peuvent entraîner une activation de la voie NFκB à un niveau comparable à celui observé pour le variant *L265P* (217). Ces mutations somatiques de *MYD88* sont en général associées à une augmentation des capacités d'oligomérisation du domaine TIR de MYD88. Ce domaine, dans les formes mutantes, interagit avec la forme sauvage de MYD88 ce qui explique que les mutations de type hétérozygotes peuvent jouer le rôle de mutation *driver* (11)

La fréquence de la mutation *MYD88L265P* est faible dans la LLC. Toutefois, ce variant est identifié dans le clone tumoral dominant (161, 251, 255). D'autre part, cette mutation est associée à un processus d'évolution clonale dans cette hémopathie (61). Les cellules tumorales porteuses de la mutation *MYD88L265P* présentent une activation constitutive de NFκB et de STAT3 et secrètent plus de cytokines et de chémokines que les cellules de LLC exprimant la forme sauvage de *MYD88* en réponse à la stimulation par des ligands des TLR (137, 251). La mutation *MYD88* pourrait conférer un avantage de sélection pour les cellules tumorales et donc constituer une mutation de type «driver».

Au total, la modélisation de la mutation *MYD88L265P* a démontré le rôle joué par ce variant dans les processus de survie cellulaire. En favorisant l'assemblage spontané du complexe du «Myddosome» comprenant entre autre MYD88 et IRAK1/4, la mutation *MYD88L265P* entraîne l'activation des voies de signalisation NFκB et JAK/STAT. Ce variant pourrait aussi moduler l'interaction de la cellule tumorale avec son microenvironnement. *MYD88L265P* est donc une mutation de type gain de fonction.

2. Etude fonctionnelle de la mutation *MYD88L265P* dans la MW

L'étude des lignées cellulaires de MW, BCWM1 et MCWM1, mais aussi de cellules primaires de MW, a permis de modéliser l'impact fonctionnel de la mutation *MYD88L265P* (81, 124, 323). Une diminution de l'activation de la voie NFκB est observée en présence d'inhibiteurs d'IRAK1/4 et de différents inhibiteurs d'homodimérisation de MYD88 (246, 299) (Figure 4). D'autre part, l'inhibition de MYD88 entraîne une diminution de la phosphorylation de STAT3 ce qui suggérerait l'activation de la voie JAK/STAT par la mutation gain de fonction *MYD88L265P* comme dans les DLBCL (217, 246).

Une approche combinée avec des inhibiteurs chimiques de MYD88 et par lentivirus a montré une diminution de la phosphorylation IκBα et de la survie des cellules mutées *MYD88L265P* (323). En revanche, la surexpression de la forme mutée augmente la survie cellulaire. Les études par coimmunoprécipitation ont identifié BTK comme partenaire de MYD88 dans les cellules de MW mutée *MYD88L265P*. Un avantage de liaison de MYD88 pour la forme phosphorylée de BTK est observé. La kinase BTK a été initialement identifiée dans l'agammaglobulinémie liée à X (XLA), une maladie rare caractérisée par un blocage des cellules B à un stade pré B. Cette kinase est aussi impliquée dans la transduction du signal de la voie des TLR et du BCR (240). Une augmentation de la phosphorylation de BTK est observée dans des cellules de MW exprimant *MYD88L265P*. Le traitement par un inhibiteur de BTK ou par des inhibiteurs d'IRAK1/4 diminue la liaison de MYD88 à BTK et entraîne une apoptose des cellules tumorales. Une synergie est observée en cas d'association de ces agents en termes de capacité d'inhibition de NFκB et de survie cellulaire. Ces résultats ont d'autre part montrés que BTK est une cible en aval de la signalisation induite par la mutation *MYD88L265P* et constituent le rationnel préclinique pour l'administration d'inhibiteurs de BTK

comme l'ibrutinib seul ou en association avec des inhibiteurs d'IRAK pour le traitement de la MW (323, 327).

Le variant *MYD88L265P* interagit avec TRAF6 : la formation du complexe MYD88L265P/IRAK/TRAF6 conduit à l'activation de la kinase TAK1 qui, *in fine*, permettra une activation constitutive de la voie NFκB. Une augmentation de la synthèse d'IL6 et d'IL10 est alors observée (7). L'utilisation d'un inhibiteur de Tak1, l'5Z-7-oxozeaenol, montre une diminution de la prolifération cellulaire, de la survie cellulaire et de la sécrétion de cytokines dans un modèle de MW muté *MYD88L265P* (7). Toutefois, tous les signaux activés par MYD88 n'impliquent pas le recrutement des kinases IRAKs (11, 136). Une autre approche pourrait consister à utiliser des peptides inhibiteurs de MYD88 bloquant l'interaction des domaines TIR-TIR et entraînant une perte de viabilité cellulaire (11, 184). Cibler directement MYD88 pourrait donc permettre de limiter les activations de voies de signalisation collatérales activées par des inhibiteurs plus en aval de MYD88 (183, 184).

La mutation *MYD88L265P* induit la transcription de l'IL6 et de la kinase HCK (*Hematopoietic kinase*) (324). HCK appartient à la famille des kinases Src et participe à l'activation d'autres voies de signalisation intracellulaire comme celle de PI3K/AKT ou MAPK/ERK. Une expression aberrante d'HCK est décrite dans la MW (65, 110, 324). D'autre part, HCK participe à la régulation de l'expression de BTK dans la MW et constitue une cible d'action pour l'ibrutinib. L'IL6 participe à l'activation d'HCK sans en réguler la transcription. L'inhibiteur d'HCK, l'A419259, présente une activité antitumorale en terme de prolifération et de survie cellulaire dans la MW. Cet effet est indépendant du type de mutation de *MYD88* et de la présence de mutation de BTK ce qui ouvre la perspective de nouvelles pistes thérapeutiques. Toutefois, des mutations d'*HCK* ou celle de *BTK* pourraient être associées à une résistance à l'ibrutinib *in vitro* (324, 327).

Une surexpression constitutive du facteur de transcription Sp1 (*Specificity Protein 1*) est observée dans la MW (92). Par des études fonctionnelles de perte et de gain de fonction, il a été montré le rôle de la dérégulation de Sp1 dans la prolifération et la survie cellulaire dans la MW (92). Une diminution de l'expression de BTK est mise en évidence lors d'un traitement avec un inhibiteur de Sp1. Ces données suggèrent l'intérêt de combiner inhibiteur de BTK et inhibiteur de Spi1 qui exercent un effet synergique sur la prolifération et la survie cellulaire dans la MW (92). D'autre part, il existe une activation de la voie NFκB et de STAT3 indépendante de MYD88 dans la MW. L'implication d'autres voies de signalisation pourraient être envisagées dans la physiopathologie de la MW. En effet, les voies de signalisation PI3K/Akt et PKCβ (Proteine kinase Cβ) sont constitutionnellement activées dans la MW ce qui pourrait induire *in fine* une activation de NFκB (10, 168, 170, 202). Une activité antitumorale des inhibiteurs de PI3K et de PKC est observée *in vitro* dans la MW (49, 260). Le lien fonctionnel avec la mutation *MYD88L265P* reste toutefois à évaluer dans la MW.

Figure 4 : Rôle de la mutation *MYD88L265P* dans la Maladie de Waldenström (7, 51, 246, 299)



B. Vers une redéfinition moléculaire de la MW par la mutation MYD88L265P ?

La découverte de la mutation *MYD88L265P* a donc sans nul doute « révolutionné » la maladie de Waldenström aussi bien sur le plan physiopathologique que diagnostic. Toutefois, la question de la définition de la MW sur la base de la mutation *MYD88L265P* dans les lymphomes lymphoplasmocytaires est en train d'émerger.

La mutation *MYD88L265P* pourrait constituer un évènement initiateur dans la MW au regard de sa fréquence élevée dès le stade MGUS à IgM (231, 305, 334). La mutation *MYD88L265P* est observée à la fois dans le compartiment lymphocytaire que plasmocytaire du clone tumoral (109, 299). De rares cas de mutation homozygote de la mutation *MYD88L265P* sont rapportés aussi bien dans des formes sporadiques que familiales de MW (<10% des cas). Le rôle physiopathologique de ce profil mutationnel, qui conduit à la perte de l'allèle normal, reste à définir (299, 300).

Toutefois, cette mutation peut être détectée dans d'autres syndromes lymphoprolifératifs parfois sans différenciation lymphoplasmocytaire et/ou sans pic à IgM (6, 93, 112, 334). Par exemple, la mutation *MYD88L265P* a été observée chez des patients présentant un lymphome lymphoplasmocytaire (LLP) non IgM ou des LLC (112, 141, 255, 299). Dans les MZL, la présence de la mutation *MYD88L265P* a été décrite dans de rares formes sans IgM (229, 262, 283). Enfin, des mutations de *MYD88* sont présentes dans 30 à 40% des cas de DLBCL de type ABC, une classe de lymphome agressif (34). L'expression d'une IgM a été associée au type ABC (262B). Une même mutation est donc présente dans des modèles d'hémopathies différentes de la MW qui, pour certaines, constituent ses principaux diagnostics différentiels.

L'origine de la cellule où survient l'évènement, le microenvironnement tumoral et les anomalies additionnelles génomiques sont autant de facteurs pouvant modifier l'histoire « naturelle » du clone muté *MYD88* (145). La mutation *MYD88L265P* est associée à une rapide division des cellules B en l'absence d'activation des TLR mais qui peut être inhibée par différents agents (chloroquine,...) ou une abolition du TLR9. Ces données suggèrent la persistance d'une dépendance de la cellule B mutée *MYD88L265P* à une activation du TLR9 (314). Une accumulation de cellules autoréactives B n'est observée que lors de la surexpression de Bcl2. Toutefois, cet effet sur la prolifération et l'activation de la voie NFκB est rapidement régulée par l'induction de *TNFAIP3*, un inhibiteur de la voie NFκB (309). Ces données suggèreraient qu'une association de plusieurs évènements génomiques serait nécessaire pour entraîner un phénotype tumoral dans une cellule mutée *MYD88L265P* (314). Des mutations inactivatrices de *TNFAIP3* peuvent être observées dans les lymphomes avec mutation *MYD88L265P* comme dans la MW (38, 35, 183).

D'autre part, un modèle murin avec expression conditionnelle de la mutation *MYD88L252P*, homologue murin de la mutation *MYD88L265P*, a été récemment étudié (145). Les souris développent

un syndrome lymphoprolifératif B. Une transformation en un lymphome agressif n'est observée que dans environ 30% des cas. L'expression de la forme mutée *MYD88L265P* entraîne un blocage de la différenciation B après le passage dans le centre germinatif. Le phénotype observé montre principalement une infiltration tumorale des ganglions et de la rate, la moelle osseuse ne présentant pas de signes d'envahissement. C'est l'association avec une hyperexpression de Bcl2 qui conduit à un phénotype complet de DLBCL ABC avec une pénétrance complète. La mutation activatrice *MYD88L265P* pourrait être considérée un évènement initiateur mais pas un évènement transformant dans la MW (145, 314). Même si l'incidence des transformations de MW en DLBCL est évaluée à moins de 5% des cas de MW après 15 ans de suivi, le phénotype est le plus souvent de type ABC et la mutation *MYD88L265P* est observée (57B).

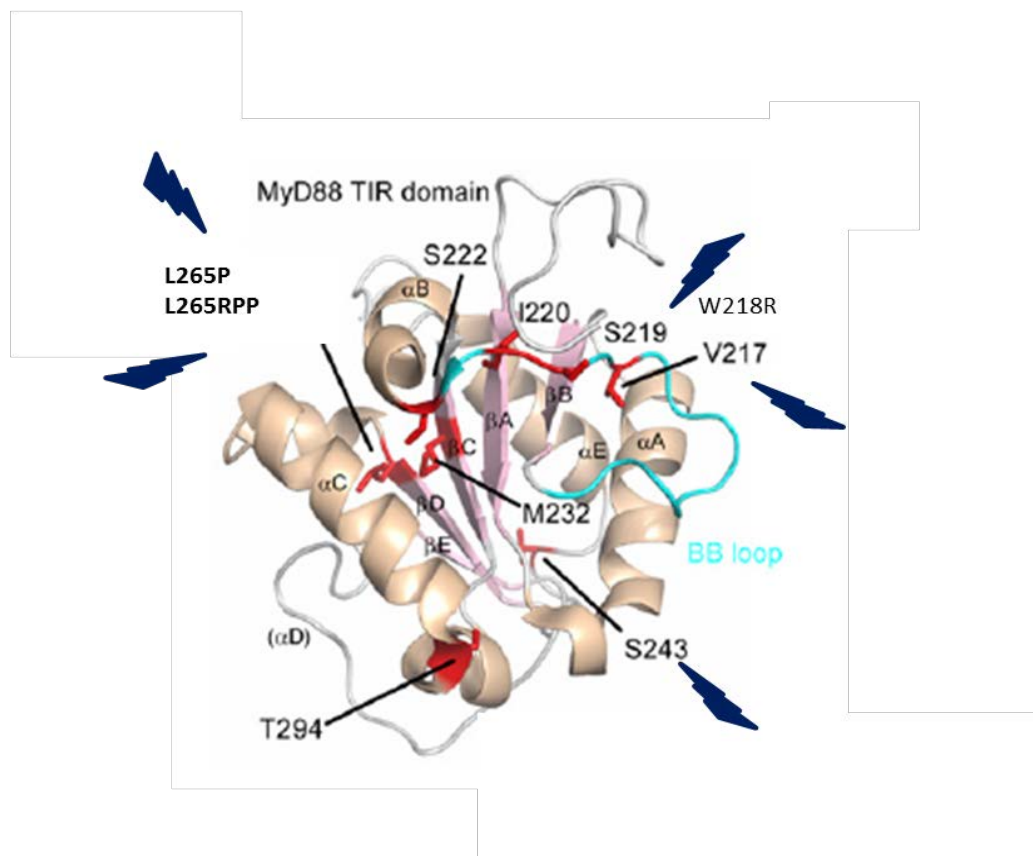
La comparaison des caractéristiques des MW selon leur statut mutationnel *MYD88L265P* peut apporter d'autres éléments de réflexion. L'analyse différentielle des profils clinico biologiques des MW a en effet montré une lymphocytose plus élevée, un pic IgM de plus faible intensité, un plus faible envahissement médullaire ou une fréquence plus faible de réarrangement IgVH3-23 dans le groupe de patients *MYD88^{WT}* (93, 138, 334). Une fréquence plus élevée de splénomégalie est aussi décrite chez ces patients (246). Une variation de nombre de copie de *MYD88* associée à la trisomie 3 est observée dans le groupe des *MYD88^{WT}* : un effet dosage de gène pourrait donc être envisagé (246). Alors que le CD27 est plus fortement exprimé dans le groupe des MW sans mutation *MYD88L265P*, une faible proportion de MW ne présentent pas d'expression du CD27 ni d'hypermutation des gènes VH (138, 246). Une origine autre que celle d'une cellule « post centre germinatif » pourrait être alors envisagée dans ce sous-groupe de MW (136, 268, 287).

Récemment, l'analyse du transcriptome par séquençage à haut débit (RNA Seq) a étudié la signature transcriptionnelle des MW selon leur profil mutationnel *MYD88L265P* (132). L'hyperexpression de Bcl2 et la faible expression de Bax constituent un profil indépendant du statut mutationnel de *MYD88*. Un déséquilibre de la balance des protéines pro et antiapoptotiques serait donc commun à l'ensemble des MW (96, 132). En revanche, une certaine hétérogénéité de profil d'expression a été observée dans le groupe *MYD88^{WT}* suggérant une diversité pathogénique de ce groupe de patients. La diminution d'expression des gènes suppresseur de tumeur *WNK2* et *PRDM5* est partiellement associée à une méthylation de ces gènes (132). Une régulation négative de différents gènes associés à la voie NFκB parmi lesquels figurent l'*IL6*, *IRAK2*, *TNFAIP3*, *NFKBIZ* ou *PIM1/2* a été aussi observée. C'est principalement la surexpression de différents gènes de la voie de signalisation PI3K (*IGF1R*, *AKT2*) qui caractérise les MW *MYD88^{WT}*. L'activation constitutive d'autres voies de signalisation que celle des TLR/MYD88 pourrait ainsi exercer une forme de redondance fonctionnelle dans l'activation de médiateurs clés dans la physiopathologie de la MW.

D'autres mutations du gène *MYD88* ont été identifiées dans la MW : *MYD88S243N*, *MYD88M232T*, *MYD88S219C*, *MYD88L265PRP* (212, 302) (Figure 4B). Certaines mutations comme

la *MYD88S219C* ont été décrites comme sous clonales dans les groupes de MW *MYD88L265P* ou clonale dans les MW *MYD88^{WT}* (131). D'autre part, ces variants avaient été précédemment décrits ou caractérisés sur un plan fonctionnel dans les lymphomes à grandes cellules B dans la plupart des cas (217). Toutefois, selon la localisation de la mutation (domaine TIR ou boucle BB) ou le type de mutation, des différences en terme d'activation de la voie NFκB ou de capacité d'oligomérisation indispensable à la formation du complexe actif appelé le « Myddosome » sont observées (11, 217). En revanche, l'absence de mutation *MYD88L265P* ou la présence de ces autres mutations de *MYD88* dans la MW ne semble pas modifier de façon significative la réponse clinique à l'ibrutinib (302). La fréquence exacte de ces autres mutations de *MYD88* ainsi que leur rôle fonctionnel dans la MW reste à définir par l'étude de plus grandes cohortes (302).

Figure 4 B : Mutations somatiques de *MYD88* dans la maladie de Waldenström. Adapté Avbelj *et al.* (11). La structure de la protéine MYD88 est représentée (*Protein data bank accession number 2557*). Les hélices α sont colorées en beige, les feuillets β en rose, la boucle BB en bleu cyan. Les mutations somatiques identifiées dans la MW sont marquées par une flèche bleue. MYD88 comprend 3 domaines principaux : le domaine DD (acides aminés 54 à 109), le domaine ID (acides aminés 110 à 155) et le domaine TIR (acides aminés 159 à 296).



L'existence d'autres mutations activatrices pourrait être envisagée dans la MW. Toutefois, peu de cas de *MYD88*^{WT} ont été étudiés en séquençage complet du génome ou de l'exome (7, 299). Des mutations de *MLL-2* ont été rapportées chez 2 des 3 patients qui ne présentent pas de mutation *MYD88L265P*. D'autres mutations, non récurrentes, ont été identifiées : *JAK2*, *PRCC*, *SUZ12*, *KDM6A* et *SETD2* (131, 299). Le rôle physiopathologique de ces variants reste à élucider.

Au total, peut-on redéfinir la MW sur la base de l'association de trois critères comprenant un pic IgM, une infiltration lymphoplasmocytaire de la MO et la présence de la mutation *MYD88L265P* ? Les autres mutations de *MYD88* définissent-elles un autre sous groupe de MW ou les MW sans mutations *MYD88* doivent-elles être rattachées à un autre syndrome lymphoprolifératif ? Cette discussion reste ouverte.

I.2.2 ALTERATION DE L'AXE CXCL12/CXCR4 ET MUTATIONS DE CXCR4

A. CXCL12 et son récepteur CXCR4

Les chémokines sont de petites cytokines dotées d'une activité chimiotactique. Leur profil de sécrétion gouverne le trafic cellulaire et le recrutement de cellules effectrices à leur site d'action (3). CXCL12 ou SDF1 (*Stromal cell –derived factor-1*) est une CXC chimiokine (groupe α) produite de façon constitutive par les cellules stromales de la moelle osseuse (3, 271). CXCR4 ou CD184 est un récepteur membranaire qui a pour unique ligand CXCL12 (3). CXCR4 a été initialement décrit comme le corécepteur avec le CD4 du virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH) (316).

Le gène codant pour *CXCR4* se situe sur le chromosome 2 en q21 (53, 316). Sa séquence comprend deux exons séparés par un intron. Le premier exon code pour les 5 premiers acides aminés et la région 5'UTR, le second pour les 247 acides aminés et la région 3' UTR. La protéine comprend 352 acides aminés et est constituée d'un domaine extracytoplasmique comprenant le domaine N terminal et 3 boucles extracellulaires (ECL1, 2 et 3), de 7 domaines transmembranaires et d'un domaine intracytoplasmique formé de 3 boucles intracellulaires et de l'extrémité C terminale (ICL, 1,2 et 3) (5, 271, 316).

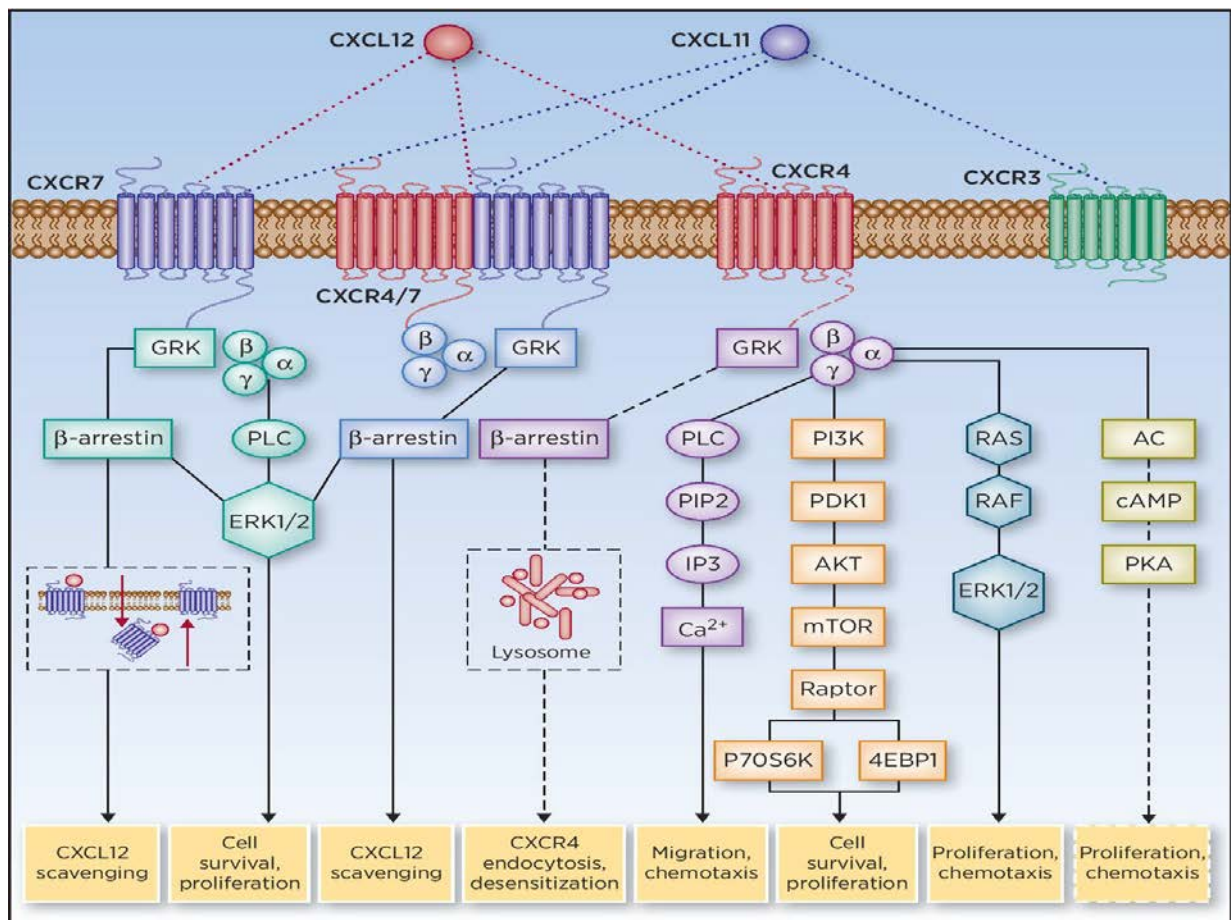
CXCR4 est un récepteur couplé aux protéines G, exprimé de façon ubiquitaire sur des cellules normales du système hématopoïétique. Un équilibre dynamique existe entre le pool membranaire et intracytoplasmique de CXCR4 (90). Une relation exclusive avec CXCL12 avait été évoquée sur la base des phénotypes comparables des souris invalidées pour l'un ou l'autre gène (213, 331). Un nouveau récepteur pour CXCL12 a été ensuite identifié, CXCR7 ou ACKR3 (91).

Sur le plan fonctionnel, l'interaction de CXCL12 avec CXCR4 induit un changement de conformation de CXCR4 déclenchant l'activation des protéines G et la mobilisation d'effecteurs intracellulaires impliqués dans différents processus cellulaires (Figure 5). L'activation des différentes voies de signalisation associées à CXCR4 telles que PI3K/mTOR, Ras ou MAPK/Erk induit une

réponse en terme de différenciation, de prolifération cellulaire, de survie cellulaire et production de médiateurs solubles comme CCL3 ou CCL4 (3, 45, 61, 69, 209). L'activation de petites protéines G des familles Rac, Rho et Ras contribuent à la réponse chimiotactique en conduisant à la polymérisation de l'actine, au réarrangement du cytosquelette, à l'activation d'intégrines et la formation d'uropodes. Après l'interaction de CXCL12 avec CXCR4, un système de rétrocontrôle négatif appelé désensibilisation est alors rapidement initié. Il débute par la phosphorylation de différents acides aminés localisés dans le domaine C terminal intracellulaire (C ter) par des kinases spécifiques, les GRK (G protein-coupled receptor kinases) (3, 271). Des études par troncation du domaine C terminal de CXCR4 ont caractérisé les sites de régulation du récepteur : 3 thréonines et 15 sérines sont pour la plupart phosphorylées et contribuent activement au cycle d'activité du récepteur. La sérine en position 338 constitue un élément clé dans ce processus (5, 48). Des protéines adaptatrices, les β arrestines, sont alors recrutées et empêchent le couplage de CXCR4 à une nouvelle protéine G et la connection du récepteur à de nouvelles voies de signalisation gouvernant en particulier l'endocytose du récepteur (163). Des modifications post traductionnelles de type ubiquitination s'opèrent alors ce qui oriente CXCR4 vers un processus de dégradation lysosomale (189). Toutefois, il est à noter, qu'une faible proportion du récepteur internalisé peut être directement recyclée à la membrane (289). Cette internalisation rapide du complexe, qui est donc dépendante de l'état de phosphorylation de la région C terminale de CXCR4, se traduit par une diminution du niveau d'expression membranaire de CXCR4 (3, 5, 289).

L'axe CXCL12/CXCR4 joue un rôle essentiel dans la domiciliation et la rétention des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ et la lymphopoïèse B mais aussi dans les processus de réparation et régénération cellulaire (3,33, 45). CXCL12 exerce son rôle de facteur chimiotactique pour différents sous type cellulaires parmi lesquels les lymphocytes B et T (32, 33). Ainsi, l'interaction CXCL12/CXCR4 participe au processus de domiciliation des précurseurs B précoces (cellules pré B et pro B) ainsi que des cellules matures comme les plasmocytes dans les niches spécifiques au niveau de la moelle osseuse ou des tissus lymphoïdes secondaires (33, 107). Une modulation du profil d'expression de CXCR4 est observée au cours de la lymphopoïèse et contribue à la répartition des différents sous populations cellulaires au sein de la niche médullaire et ganglionnaire (219). Il est à noter toutefois que le niveau d'expression de CXCR4 n'est pas strictement corrélé à la sensibilité des cellules à CXCL12 (33, 107). Le microenvironnement cytokinique pourrait donc aussi participer à la régulation de l'axe CXCL12/CXCR4 (45, 46).

Figure 5 : Signalisation de l'axe CXCR4/CXCR7/CXCL12 (271). CXCL12 interagit avec 2 récepteurs, CXCR4 et CXCR7, récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G. CXCR4 et CXCR7 peuvent former des homodimères ou des hétérodimères. CXCR7 a pour ligand CXCL12 et CXCL11. CXCR4 utilise préférentiellement les voies de signalisation associées aux protéines G. Le monomère $G\alpha 1$ inhibe l'activité adénylyl cyclase participant à la régulation de la survie cellulaire, de la prolifération et du chemotactisme. Bienque $G\alpha 1$ active les voies PI3K/AKT/mTOR et ERK1/2, le dimère $G\beta\gamma$ induit un flux calcique intracellulaire via PLC. Lors de la liaison de CXCL12/CXCR7, le récepteur induit un signal via les β -arrestines, inhibe la signalisation associée aux protéines G et active la voie des MAPK. CXCR7 induit aussi un signal médié par PLC/MAPK impliqué dans la survie cellulaire. L'hétérodimère CXCR4–CXCR7– β -arrestine peut alors activer la phosphorylation dépendante de GRK afin d'internaliser CXCR4 et de participer au contrôle de la survie cellulaire par l'activation de ERK1/2. Un processus de désensibilisation des récepteurs se produit. Les signaux d'activations sont représentés par les traits pleins, les signaux d'inhibitions par les lignes en pointillées.



B. Le syndrome de WHIM

Le syndrome de WHIM (OMIM : 193670) est un déficit immunitaire rare de transmission autosomique dominant, dont l'acronyme décrit l'association de signes cliniques définissant ce syndrome : (**W**) verrues liées à des infections récurrentes par le virus de papillome (HPV), (**H**) hypogammaglobulinémie, (**I**) infections bactériennes à répétitions, (**M**) myélokathexis ou rétention anormale des polynucléaires neutrophiles dans la moelle osseuse (5, 119). Depuis sa description en 1964, un peu plus d'une soixantaine de patients atteint du syndrome de WHIM sont à ce jour rapportés parmi lesquels de très rares cas sporadiques (5, 27, 108).

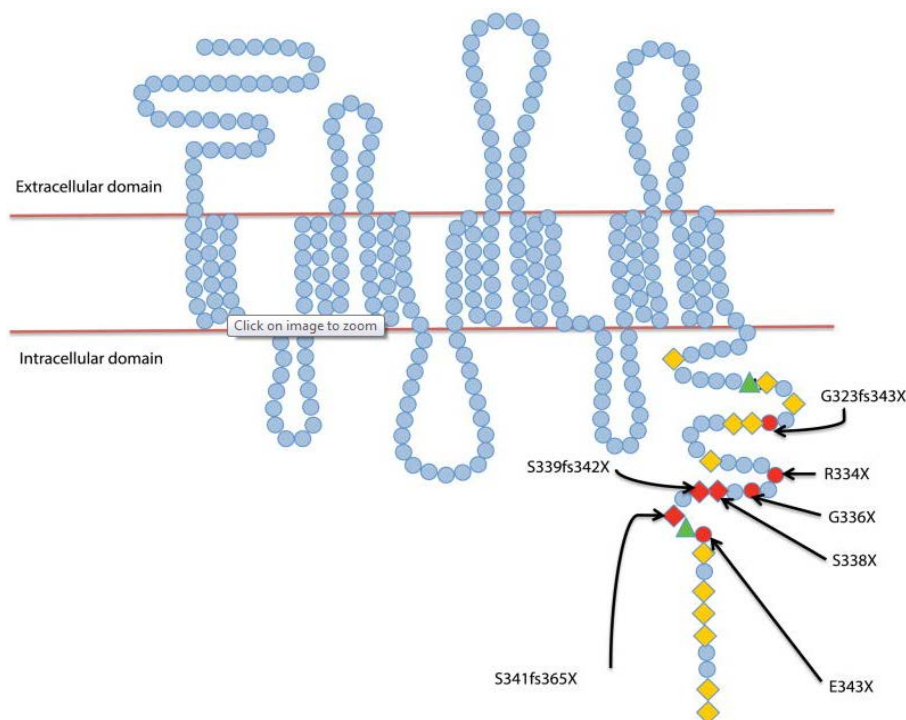
La neutropénie, souvent sévère, associée à l'hypogammaglobulinémie conduit à une susceptibilité accrue aux infections bactériennes. Les cas d'infections sévères à pyogènes (méningites, septicémies,..) sont peu fréquentes et peuvent être traitées efficacement par antibiothérapie (27). Une modification de la répartition des sous populations lymphocytaires T et B est observée dans les syndromes de WHIM. Un déficit en lymphocytes B mémoires CD27⁺ IgM⁺ ou IgD⁺ est décrit (108). La lymphopénie T ne favorise toutefois pas la survenue d'infections à germes opportunistes. La profondeur du déficit immunitaire observé chez les patients contraste avec une symptomatologie clinique parfois modérée : une dissociation génotype/phénotype caractérise donc le syndrome de WHIM (5, 27, 108, 199, 288).

Le syndrome de WHIM est associé à des mutations constitutionnelles du gène *CXCR4*. Ces mutations sont hétérozygotes et de type non sens. Les mutations de type *frame shift* ou faux sens sont en revanche rares (5, 108, 119, 177, 178, 288). Un cas exceptionnel de chromothripsis conduisant à la perte de l'allèle muté *CXCR4* et donc à la normalisation du phénotype a été rapporté (197). Les mutations de *CXCR4* sont localisées dans le domaine C terminal du récepteur et conduisent le plus souvent à une perte des 10 à 19 derniers acides aminés comprenant les différentes sérines essentielles dans le processus de désensibilisation du récepteur (5, 48). Un défaut d'internalisation du récepteur et de découplage de *CXCR4* avec les protéines G est mis en évidence. Une augmentation de sensibilité à la chémokine CXCL12 est alors observée (21). Ces mutations de *CXCR4* associées au syndrome de WHIM sont donc des mutations de type gain de fonction par défaut d'inactivation du récepteur *CXCR4* (5, 21). Des mutations de type perte de fonction de *CXCR4* ont été identifiées dans un autre déficit immunitaire rare : la lymphopénie T CD4 idiopathique (5).

Il n'a pas été rapporté de risque accru aux syndromes myélodysplasiques ou aux leucémies aiguës dans les syndromes de WHIM. La survenue de syndromes lymphoprolifératifs (lymphomes T, DLBCL,...) a été en revanche décrite (27, 58, 133). Les cancers ano-génitaux liés aux virus HPV et les complications pulmonaires secondaires aux infections répétées constituent les principales complications observées chez les patients à long terme (5, 27). Outre la prise en charge des complications infectieuses (antibiotiques, administration d'immunoglobulines polyvalentes,..), le

schéma thérapeutique des patients est en train d'évoluer au regard des résultats intéressants obtenus par l'utilisation d'un antagoniste spécifique de CXCR4, le plerixafor ou AMD3100 (196).

Figure 6 : Représentation de la structure de CXCR4 et des mutations de *CXCR4* dans le syndrome de WHIM (5). Les acides aminés sont représentés par des cercles bleus. Les sérines (losanges oranges) et les thréonines (triangles verts) du domaine intracytoplasmique sont présentées. Les mutations de *CXCR4* décrites dans le syndrome de WHIM sont signalées par la couleur rouge.



C. Axe CXCL12 /CXCR4 dans la MW

Dans la MW, les études en transcriptome et en protéomique ont montré une dérégulation de l'expression de différentes chimiokines suggérant une dérégulation de l'interface fonctionnelle entre la cellule tumorale et son microenvironnement (65, 110, 113, 304). Une grande hétérogénéité du profil d'expression de chimiokines a notamment été observée pour les récepteurs, les récepteurs d'adhésion (VLA4 et LFA-1) et leurs ligands (VCAM-1 et ICAM-1) (215). Les cellules tumorales de MW présentent donc une altération du profil d'expression de différentes molécules d'adhésion et de récepteurs de chimiokines parmi lesquels figure CXCR4 (215).

CXCR4 est exprimée par les cellules tumorales isolées de la MO de patients atteints de MW comme dans les lignées cellulaires BCWM1 et MCWM1 (49, 81, 124, 215). De plus, une augmentation de l'expression de CXCL12 est observée au niveau médullaire. Les cellules tumorales sécrètent du CXCL12 (132). La surexpression de CXCR4 et de son ligand CXCL12 suggère l'existence d'une boucle autocrine/paracrine de signalisation de la voie CXCR4. Différents facteurs

comme un contexte d'hypoxie pourraient contribuer à la régulation de l'axe CXCL12/CXCR4 (45, 46, 211). Après interaction entre CXCL12 et son récepteur CXCR4, une activation de différentes voies de signalisation intracellulaires comme MAKP/ERK, AKT et PKC est observée dans la MW (215). Une réponse chimotactile est alors observée. CXCR4 est un acteur essentiel de processus de *homing* médullaire dans la MW (101, 215). Src participe aussi à la régulation des processus d'adhésion et de migration cellulaire induits par CXCL12 (216). En revanche, la balance des protéines anti/proapoptiques (bcl2,..) n'est pas régulée par CXCL12 (50). Au total, CXCR4 est un acteur primordial dans les mécanismes de domiciliation médullaire des cellules tumorales dans la MW.

Différents agents pharmacologiques modulent l'interaction de la cellule tumorale avec son microenvironnement. Une inhibition pharmacologique par l'ibrutinib (inhibiteur de BTK) ou l'idélalisib (inhibiteur de PI3K kinase) entraîne une diminution des interactions adhésives entre les cellules tumorales et leur microenvironnement (75). L'inhibition spécifique de CXCR4, le plerixafor ou plus récemment le BMS936564/MDX1338, ainsi que l'invalidation de CXCR4, est associée à une diminution des capacités de migration et d'adhésion des cellules de MW *in vitro* (215, 260). Une diminution de l'infiltration tumorale est observée dans des modèles murins traités par le BMS936564 (260). En présence d'inhibiteur de CXCR4, une sensibilisation des cellules tumorales au bortezomib est également mise en évidence dans un contexte de co-culture avec des cellules stromales ce qui suggère l'implication d'une dérégulation de l'axe CXCL12/CXCR4 dans certains profils de chimiorésistance des cellules tumorales de MW (215, 260).

Les intégrines forment une superfamille de glycoprotéines hétérodimériques qui participent aux processus d'adhésion cellulaires et à l'interaction avec la matrice extracellulaire. Elles jouent un rôle crucial dans les réseaux fonctionnels s'établissant lors des processus de régulation de la migration et de l'adhésion cellulaires au sein de la niche médullaire (45, 70). Le VLA4 ou CD49d est un récepteur à la fibronectine et au VCAM1 (CD106) exprimé par l'endothélium activé (70). L'interaction directe entre l'intégrine CD49d et CXCR4 participe activement à la dérégulation de la survie cellulaire, à l'activation de différents réseaux de signalisation intracellulaires essentiels pour la cellule tumorale et aux processus de domiciliation cellulaire au sein de la niche médullaire dans la MW (3, 260). Cibler l'axe CXCL12/CXCR4/CD49d par le développement d'antagonistes de CXCR4 ou du CD49d seul ou en association avec d'autres agents pharmacologiques pourrait donc être envisagé dans la prise en charge thérapeutique de la MW.

D. Mutation de CXCR4 dans la MW

Les études de séquençage complet du génome ont identifié des mutations somatiques du gène *CXCR4* chez 8 des 30 patients analysés (27%) dans la maladie de Waldenström. L'analyse d'une cohorte de validation de 147 patients a permis de confirmer par séquençage Sanger la fréquence élevée

des mutations *CXCR4* (29%) (131). Les mutations du gène *CXCR4* constituent donc le deuxième groupe de variants le plus fréquemment identifié dans la MW après la mutation *MYD88L265P*.

Ces mutations somatiques sont identiques ou comparables sur le plan fonctionnel à celles initialement décrites dans le syndrome de WHIM (5, 51, 260). Dans la MW, deux classes de mutations de *CXCR4* de type non sense (*CXCR4^{NS}*) ou frameshift (*CXCR4^{FS}*) dans le domaine C terminal ont été observées représentant respectivement 49% et 51% des patients, principalement mutés *MYD88L265P*. Les mutations aboutissent donc à la synthèse d'une protéine *CXCR4* tronquée au niveau du domaine intracytoplasmique C terminal. Les mutations les plus fréquentes sont la substitution de la cytosine en position 1013 par une adénine (*C1013A*) ou par une guanine (*C1013G*) identifiées dans respectivement 4 et 7.5 % des cas dans une cohorte de 175 MW (131). La sérine en position 338 est donc affectée par ces mutations dans près de la moitié des MW mutés *CXCR4* (MW *CXCR4^{Muté}*). L'équipe d'I Ghobrial a développé un test de PCR en temps réel, plus sensible que le séquençage en Sanger, pour rechercher la mutation *CXCR4 C1013G* qui a été détectée dans 30% des 135 cas de MW inclus dans cette étude (260). Toutefois, plus de 30 mutations différentes de *CXCR4* ont donc été rapportées à ce jour dans cette hémopathie (24, 275, 300). Plusieurs mutations de *CXCR4* peuvent être identifiées dans près d'un tiers des patients en combinant des techniques de séquençage Sanger à partir d'ADN extrait de cellules CD19+ et de PCR allèle spécifique (335).

Les variants somatiques de *CXCR4* ont été recherchés dans d'autres hémopathies lymphoïdes B. La mutation *CXCR4C1013G* n'a pas été détectée dans les LLC, les leucémies à tricholeucocytes, les myélomes à IgM, les MGUS à IgG, A ou IgG, les lymphomes lymphoplasmocytaires et les amyloses (260, 335). En revanche, cette mutation a été mise en évidence dans environ 10% des cas de DLBCL et des lymphomes de la zone marginale dans de petites séries (260, 275). L'analyse des données de séquençage exomique ou du génome complet ne rapporte que de rares cas d'altération de *CXCR4* dans ces hémopathies (183, 191, 229, 251, 262, 313). La mise en évidence de mutation *CXCR4* de type WHIM constitue donc principalement une caractéristique de la MW (131, 260).

La valeur pronostique clinique des mutations de *CXCR4* a été étudiée dans une série rétrospective de 175 patients (300). Le suivi médian était de 58 mois (8 – 281). Les mutations de *CXCR4* étaient plus fréquentes dans les groupes des patients avec une MW de type symptomatique. Le groupe des patients mutés *CXCR4* présentait un profil clinico biologique particulier au diagnostic caractérisé par un infiltrat plus important de la moelle osseuse, une plus faible incidence des adénopathies, une thrombopénie plus importante et une fréquence plus élevée de syndrome d'hyperviscosité conduisant à l'initiation de plasmaphèreses. Un pic d'IgM plus élevé a d'ailleurs été observé dans le groupe *CXCR4^{Mutés}* même si la fréquence des patients avec plus de 70g/l, facteur pronostique indépendant, n'est pas significativement différente entre les 2 groupes (205, 300). En revanche, même si une association des mutations de *CXCR4* aux formes symptomatiques de MW a été montrée, ces variants ne présenteraient pas de valeur pronostique clinique dans cette étude

rétrospective (300). En revanche, un taux plus faible de réponse à l'ibrutinib a été récemment rapporté dans le groupe des patients mutés *CXCR4* dans une cohorte de 63 patients (301B).

E. Caractérisation fonctionnelle des mutations CXCR4 dans le MW

Deux études menées par les groupes de S Treon et d'I Ghobrial ont analysé l'impact fonctionnel de la mutation la plus fréquente *CXCR4 S338X* en utilisant des stratégies expérimentales différentes (49, 260). Une augmentation de la prolifération cellulaire et du taux de sécrétion d'IgM sont observés dans un modèle murin *CXCR4C1013G*. La survie de ces souris est diminuée par rapport au groupe de référence. Les souris présentent par ailleurs une infiltration tumorale extramédullaire comprenant des localisations rénales et pulmonaires (260). Un défaut d'internalisation de *CXCR4* après stimulation par *CXCL12* est rapporté, ce qui suggère une anomalie du processus de désensibilisation du récepteur *CXCR4*. Des anomalies comparables ont été observées dans la modélisation des syndromes de WHIM (5, 21, 22, 260). Une augmentation du niveau d'expression de la protéine *CXCR4* en cytométrie de flux est par ailleurs observée chez les patients mutés *CXCR4C14013G* dans une série de 11 échantillons. La modélisation de la mutation dans les lignées BCWM1 ou MCWM1 par infection lentivirale a confirmé l'existence d'une dérégulation de plusieurs réseaux fonctionnels comme des gènes impliqués dans la régulation des protéines G, *RGS1* (*Regulator of G-protein*), et *RGS13* ou des phosphatases *DUSP4* (*Dual specificity phosphatase*) ou *DUSP5* par analyse du transcriptome (132, 260). D'autre part, une activation des voies de signalisation intracellulaire AKT et ERK est mise en évidence ainsi qu'une augmentation de la survie cellulaire dans les cellules mutées *CXCR4C1013G* (49). La mutation *CXCR4S338X* a été associée à profil de chimiorésistance à différents classes thérapeutiques in vitro. Ainsi, une diminution de sensibilité à l'inhibiteur de BTK, l'ibrutinib et à l'idélalisib, un inhibiteur de la voie PI3K, est décrite dans ces modèles précliniques de MW (49, 260). L'exposition de cellules tumorales mutées *CXCR4* à du *CXCL12* induit une diminution de la sensibilité à l'ibrutinib et à l'idélalisib (49). En revanche, aucune modification significative du profil de sensibilité aux inhibiteurs de protéasome, bortézomib ou carfizomib, n'est observée. La diversité des mutations observées dans la MW rend difficile la modélisation fonctionnelle de l'ensemble de ces variants. Toutefois, des effets comparables à ceux de la mutation *CXCR4S338X* sont rapportés lors de l'étude de la modélisation d'autres mutations de type *frame shift* dans le MW (51). Cibler directement MYD88 par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques a montré le rôle prépondérant de la mutation *MYD88L265P* dans la survie cellulaire de la MW dans ces modèles mutés *CXCR4* (51).

En conclusion, les mutations du gène *CXCR4* pourraient être considérées comme des mutations gain de fonction dans la MW.

I.2.3 AUTRES MUTATIONS IDENTIFIEES DANS LA MW

D'autres mutations ont été identifiées à des fréquences variables dans la maladie de Waldenström mais leur rôle sur le plan physiopathologique ou dans la progression de la maladie n'est pas caractérisé (7, 38, 131, 247, 299). Ces variants ont été principalement identifiés par l'étude du séquençage complet du génome complet ou de l'exome ou par l'étude des régions de CNA ou d'UPD.

Le gène *ARID1A* (*AT-rich interactive domain 1A*), qui est un membre de la famille SWI (switch mutants)/SNF (sucrose non-fermenting), est muté dans 9 à 17 % des cas de MW (131, 132). Les mutations observées sont de type inactivatrices. Dans la MW, les patients mutés *ARID1A* et *MYD88* L265P présentent une maladie plus agressive avec un infiltrat médullaire plus important et des cytopénies plus profondes. *ARID1A* pourrait donc contribuer à un processus de progression tumorale dans la MW. D'autre part, une signature transcriptionnelle de 16 gènes a été associée aux mutations *ARID1A*(132). Des mutations du gène *ARID1A* ont été mises en évidence initialement dans les maladies génétiques rares telles que le syndrome de Coffin Siris (148). Des mutations somatiques d'*ARID1A* ont été identifiées dans différentes hémopathies lymphoïdes B comme les DLBCL, les lymphomes folliculaires ou les lymphomes de la zone marginale à des fréquences comparables à celles observées dans la MW (183, 191, 229, 320). *ARID1A* est aussi considéré comme un gène suppresseur de tumeur dans différents modèles (223). En effet, le complexe SWI/SNF est essentiel au processus de remodelage de la chromatine qui contribue à la régulation épigénétique de la transcription. Ce complexe constitué d'une douzaine de partenaires protéiques est caractérisé par la présence d'une fonction ATPase permettant le remodelage du nucléosome (223, 320). *ARID1A* est ainsi impliqué dans de nombreuses interactions protéine-protéine avec des facteurs de transcription (GATA1, KLF1,...), des enzymes modifiant les histones, des gènes suppresseurs de tumeurs,... Il est à noter qu'*ARID1B*, localisé en 6q25, est fréquemment délété dans la MW (38, 131).

L'étude d'une cohorte de 54 patients a identifié des mutations du *CD79B* et du *CD79A* dans respectivement 9 et 5% des cas de MW (247). Ces variants sont principalement mis en évidence dans le groupe des MW mutés *MYD88*L265P. Les mutations du *CD79B* sont comparables à celles initialement observées dans les lymphomes à grandes B de type ABC et touchent principalement le codon codant pour la tyrosine en position 196 dans le domaine ITAM (73). Le *CD79B* forme un hétérodimère avec le *CD79A* constituant ainsi une structure essentielle du BCR (36). Le rôle physiopathologique de ces mutations n'a pas été exploré sur un plan fonctionnel dans la MW à la différence des DLBCL (73).

Les autres mutations récurrentes sont peu fréquentes dans la MW : *TP53*, *HIST1H1E*, *TNFAIP3*, *TRAF3* ou *MYBBP1A* (7, 131, 299). D'autres variants ont été identifiés dans la MW à des fréquences inférieures à 5% c'est-à-dire observés dans un seul cas dans la série des 30 patients étudiés par séquençage complet du génome : *MUC16*, *RAG2*, et *NOTCH2*. Aucune autre mutation récurrente

dans la voie des TLR, de NFκB ou de gènes impliqués dans la différenciation plasmocytaire n'a été rapportée dans la MW (7, 299). Le rôle fonctionnel de ces différentes anomalies génomiques, la confirmation de leur fréquence ainsi que la valeur pronostique clinique de ces mutations reste à évaluer dans de plus grandes cohortes de patients.

I.2.4 PROFILAGE GENOMIQUE DANS LA MW

L'émergence de nouvelles techniques comme l'hybridation génomique comparative de haut débit sur puces (*CGH Arrays*) a permis une analyse pangénomique des variations du nombre de copies et d'identifier des micro anomalies non détectables par les techniques de cytogénétiques conventionnelles dans la MW (42, 231, 247). Les puces à SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) combinent l'allélotypage à la détection de perte et gain de matériel génomique (CNA) (116, 224). Cette approche permet donc la mise en évidence de nouveaux mécanismes oncogéniques telles que les pertes d'hétérozygotie (LOH) sans variation de nombre de copie (disomies uniparentales acquises ou UPD). Deux types d'événements peuvent être associés aux LOH :

- les événements de type gain de fonction :
 - o mutation activatrice
 - o effet de dosage génique ayant un impact sur la transcription
 - o autre mécanisme de dérégulation positive de l'expression
- les événements de type perte de fonction :
 - o délétion
 - o LOH et mutation avec dérégulation négative de l'expression
 - o effet de dosage génique avec haplo insuffisance
 - o méthylation.

Les disomies uniparentales se définissent par la duplication partielle ou totale d'un chromosome homologue issu d'un même parent. Si une cellule tumorale est porteuse d'une mutation possédant un avantage prolifératif à l'état hétérozygote, le clone porteur de l'UPD présentera un aspect homozygote de la mutation et sera susceptible de devenir le clone dominant au cours de l'évolution (Figure 7) (116, 224).

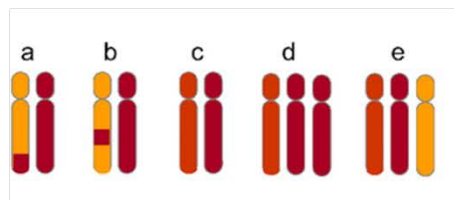
Figure 7 : Mécanismes génomiques associés à une perte d'hétérozygotie, adapté de (116) et (226) :

1 : Classification des types de perte d'hétérozygotie (LOH) sans variation du nombre de copie (CN-LOH). Les CN-LOH peuvent être classées selon leur origine ou leur localisation. Elles peuvent être acquises (disomie uniparentales acquises ou UDP), clonales ou constitutionnelles. Les CN-LOH non clonales peuvent résulter d'un événement mitotique embryonnaire, conduisant à une mosaïque ou être constitutionnelle. Elles peuvent être numériques ou segmentaires. Les CN-LOH segmentaire dérivant d'un *crossing over* sont télomériques ; ces anomalies peuvent aussi impliquer un chromosome entier.

2 : Mécanismes mitotiques de formation des CN-LOH. A : Les CN-LOH peuvent apparaître comme le résultat d'une recombinaison mitotique entre chromosomes homologues et survenir dans une cellule fille durant la mitose. B : Une CN-LOH peut être la conséquence d'une délétion suivie d'une recombinaison avec le chromosome homologue.

3 : Mécanismes pathogéniques des LOH : Les CN-LOH peuvent entraîner la duplication d'un variant germinal ou d'une mutation somatique ce qui peut conduire à une augmentation d'expression par la perte d'un marqueur soumis à empreinte génétique ou à une diminution d'expression du gène par la duplication d'un marqueur à empreinte génétique. Une délétion (Del) peut avoir un impact sur le niveau d'expression du gène : une augmentation d'expression peut être observée par perte d'un allèle soumis à empreinte génétique, une diminution d'expression peut être observée par perte de l'allèle exprimé ou haploinsuffisance.

1



Types de disomie uniparentale acquise

Partielle

a Télomérique

b Intersticielle

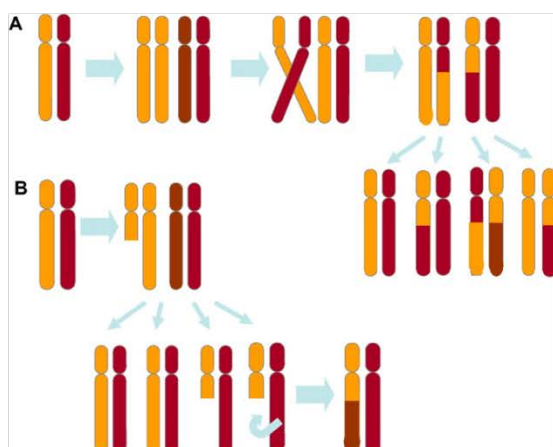
Numérique

c : Disomie

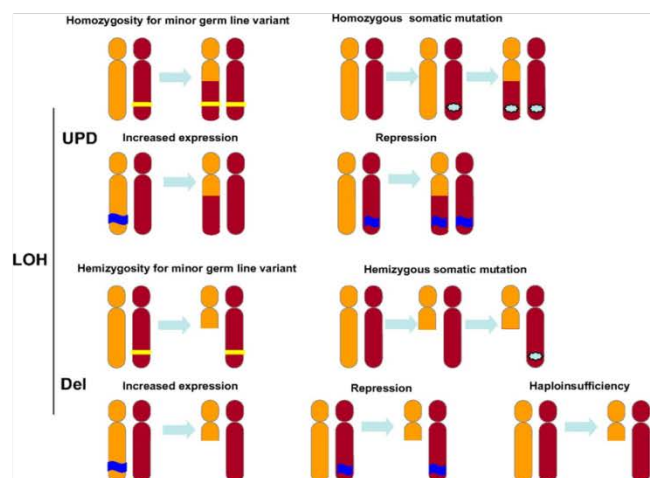
d: Trisomie

e: Gain/Trisomie

2



3



Dans la MW, l'étude d'une cohorte de 42 patients par *CGH arrays* (CGHa) a montré la présence d'anomalies dans 83% des cas (38). L'étude d'une cohorte de 31 patients a permis d'établir la première cartographie génomique par puces à SNP (248). Au total, 61 anomalies chromosomiques ont été observées, 58 CNA (33 gains, 25 délétions) chez 58% des patients. De nouvelles anomalies cryptiques ont été ainsi caractérisées par CGHa ou puces à SNP comme les délétions 1p36, les gains en Xq ou les délétions en 6p (38, 247, 248). Une médiane d'environ 3 anomalies par patient est observée. Ces études ont permis la définition des régions minimales altérées des principales anomalies génomiques de la MW.

La plus fréquente des anomalies observée est la délétion totale ou partielle du bras long (q) du chromosome 6 (30-40% des cas). Cette délétion 6q est associée à un gain en 6p dans environ 12% des cas (38). Quatre régions minimales délétées (MDR) en 6q ont été caractérisées dans la MW par la première étude par CGHa (38). Les MDR les plus fréquentes sont celles en 6q21 se situe le gène *PRDM1* impliqué dans la différenciation plasmocytaire et en 6q23 où est localisé le gène *TNFAIP3* qui code pour A20, un régulateur de la voie NFκB (38, 309). Braggio *et al.* ont également mis en évidence des délétions bialléliques ou des inactivations par mutation de deux gènes inhibiteurs de la voie NFκB : *TRAF3* et *TNFAIP3* chez, respectivement, 5,3 et 4,2 % des patients atteints de MW (38, 309). En outre, les délétions monoalléliques de *TNFAIP3* sont associées à une diminution de l'expression de *TNFAIP3*, ce qui suggérerait un phénomène d'haploinsuffisance. La MDR en 13q14 comprend les miARN 15 et 16. L'activation constitutive de la voie NFκB observée dans la MW pourrait donc être associée à la présence d'altérations génomiques de régulateurs essentiels de la voie NFκB (168).

D'autre part, les études par puces à SNP ont permis d'identifier la présence de CN-LOH/UPD principalement dans le groupe des MW symptomatiques. Ce type d'anomalie est observé dans moins de 15% des cas (231, 247). Les UPD sont de tailles variables. Des régions chromosomiques récurrentes ont été observées (3p,...). Des UPD du locus de *MYD88* ont été ainsi mises en évidence ce qui conduit à un profil homozygote de la mutation *MYD88L265P* (131, 246). De même, des UPD récurrentes en 17q affectant le locus du gène du *CD79B* impliqués dans la transduction du signal du BCR ont été rapportées (248). En conclusion, une variation de charge mutationnelle de certains variants jouant un rôle essentiel dans la physiopathologie pourrait être associée à la présence d'UPD dans la MW.

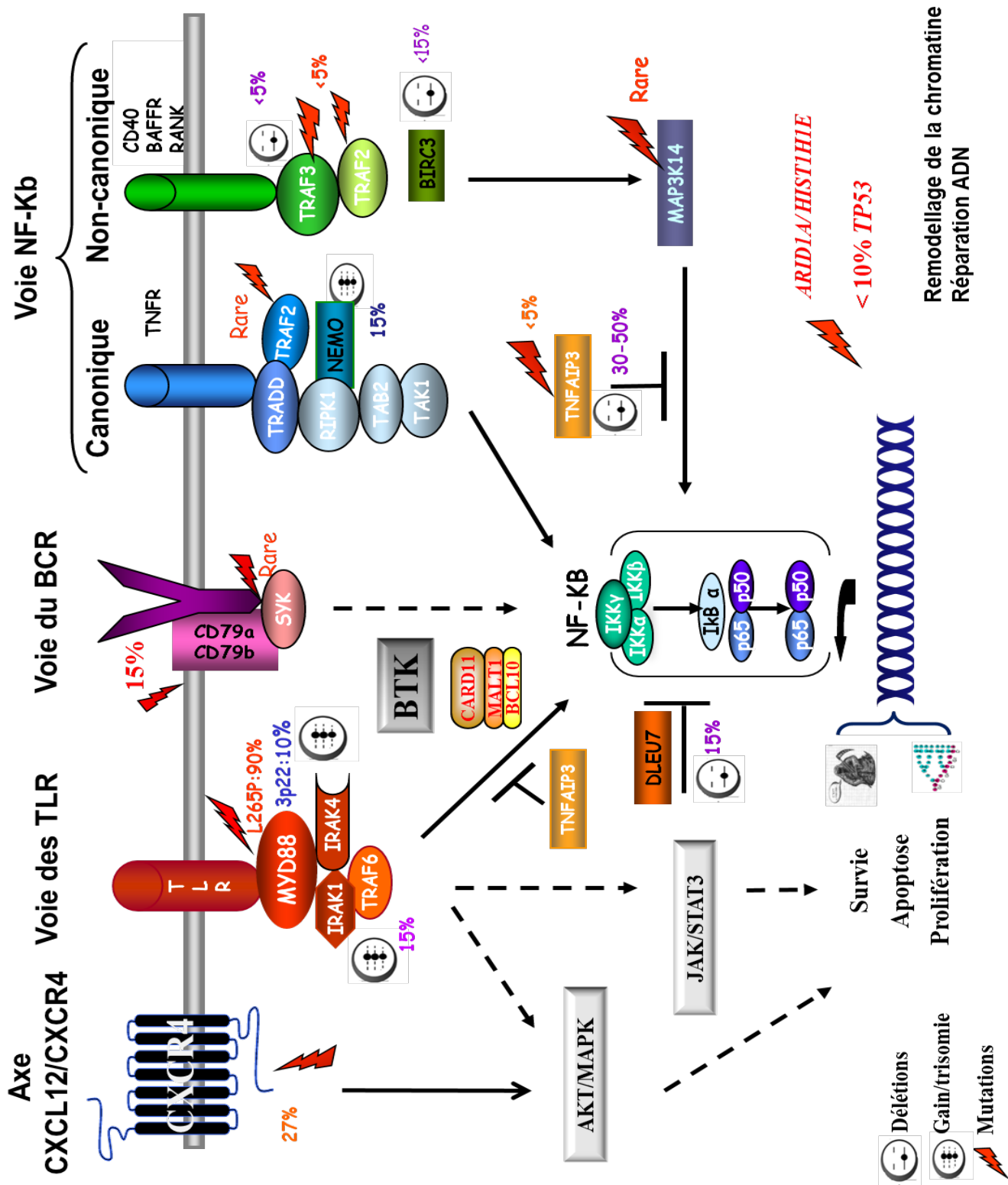
Une complexité génomique plus importante chez les patients MW symptomatiques a été mise en évidence (248). En effet, une fréquence plus élevée de plus de 3 CNA ou d'UPD est observée dans le groupe des patients symptomatiques, ce qui suggérerait l'existence d'une instabilité génomique plus importante (248). Plus récemment, l'équipe de B Paiva a confirmé, dans une cohorte de 26 patients, la fréquence plus élevée d'altérations chez les patients symptomatiques (231). L'existence d'anomalies de processus de réparations de l'ADN pourrait être évoquée dans la MW. En effet, des mutations

affectant des gènes impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN ont été rapportées (299). De rares cas de chromothripsis ont été aussi identifiés dans la MW (données non publiées, 131). Des délétions et des gains de moins de 5 mégabases ont été observés dans la MW par les études par puces à SNP (231, 248). De micro-variations de nombre de copies ont été rapportées par l'étude du séquençage du génome complet dans la MW (131). Ainsi, des microdélétions en 6q de différents gènes et impliqués dans la régulation de la voie NFκB ou de la différenciation plasmocytaire ont été décrites (131). Leur fréquence reste à valider dans des cohortes plus larges par d'autres techniques. Dans la MW, une diminution du niveau d'expression d'une protéine impliquée dans les processus de réparation de l'ADN, Ku70, avait été observée par des études en protéomique (233). Ces données pourraient suggérer l'existence d'un « génome instable » dans la MW. Le rôle de ces anomalies additionnelles au sein du clone muté *MYD88L265P* reste toutefois à évaluer lors de la progression tumorale de la maladie.

En conclusion, les études de profilage génomique à haut débit ont permis de mieux caractériser les principales anomalies génétiques initialement décrites par le cytogénétique, d'identifier de nouvelles anomalies cryptiques et de mettre en évidence des phénomènes de CN LOH/UPD dans la MW. Différents voies de signalisations essentielles pourraient être modulées par l'ensemble de ces anomalies additionnelles (Figure 8).

Figure 8 : Panorama génomique dans la MW. Adapté de Poulain *et al.*(247).

% : Pourcentage ; ⊥ Inhibition



I.2.5 ANALYSE DE LA SIGNATURE TRANSCRIPTIONNELLE DE LA MW

A. *L'étude du transcriptome*

L'analyse différentielle des profils d'expression génique a conduit à l'identification d'une « signature moléculaire » de la macroglobulinémie de Waldenström qui distingue cette hémopathie à la fois du myélome multiple et de la leucémie lymphoïde chronique mais aussi de différentes sous populations lymphocytaire B normales (65, 110, 132, 231) (Tableau 7B) .

Dans la première étude publiée, la signature de la MW serait toutefois plus proche de la LLC que du MM dont la signature s'apparente à celle de lymphocytes mémoires. Les lymphocytes de LLC se différencient de ceux de la MW par l'expression de quatre gènes. *Marcks1* est surexprimé dans la MW par rapport à la LLC, *Atnx1*, *Lef1*, et *Fmod* sont sous-exprimés (65). Des variations du profil d'expression de différents gènes impliqués dans la lymphopoïèse B sont observées. *SYK* et *PAX5* sont surexprimés alors qu'une sous expression des gènes *IRF4*, du récepteur à l'IL4 impliqué dans les processus de survie du lymphocyte tumoral de LLC, de *BACH2* et *BLIMP1* est détectée (65). Un panel de 73 gènes a pu être identifié dans la MW par comparaison à la LLC en analyse supervisée (65). Toutefois, la comparaison du profil transcriptionnel de la MW, de la LLC et du MM a montré l'impact du clone plasmocytaire dans la modulation du profil d'expression génique. Cette étude du transcriptome a également confirmé une surexpression de l'*IL6*, associée à la voie de signalisation des MAPK (*Mitogen activated protein kinases*) dans la MW (65). D'autres gènes présentent un profil d'expression caractérisant la MW. Une surexpression du gène du *BCR* et du *CD1c* impliqué dans la présentation antigénique via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I est mise en évidence.

Gutiérrez *et al.* ont analysé les profils transcriptionnels de 10 patients atteints de MW, 11 LLC et 12 MM en exploitant une stratégie différente d'isolement des cellules tumorales (110). Une signature de 37 gènes a été caractérisée. Différents gènes impliqués dans la différenciation plasmocytaire et dont le niveau d'expression varie par rapport aux lymphocytes B des MW et les plasmocytes des MM ont ainsi été identifiés (144). Une diminution du niveau d'expression de l'ADAM28 est observée. Cette métalloprotéase joue un rôle dans l'adhésion cellulaire et la migration trans-endothéliale des lymphocytes B ce qui suggérerait une modification de l'interface fonctionnelle entre les cellules tumorales et leur microenvironnement (198).

Une étude plus récente a utilisé une stratégie d'isolement des cellules B basée sur l'expression du CD22 et du CD25 (231). Ainsi, le transcriptome de la population clonale des MW présente une signature de 327 gènes qui la distingue des cellules B normales CD25-CD22+ par la dérégulation de *BACH2*, *IL4R*, *TRAF3* ou *TNFRS10B*, gènes identifiés par les précédentes études du transcriptomes dans la MW (65, 110, 231). Une diminution du niveau d'expression du *CD200* et de *LAIR1*, confirmée par les études immunophénotypiques en cytométrie de flux, est observée. En revanche, un profil transcriptionnel restreint de 51 gènes distingue la MW de la population homologue normale

CD22+low CD25+. Certaines voies de signalisation intracellulaire semblent plus fortement dérégulées dans la MW conférant un profil de cellules B CD22 low CD25+ « activée » au clone tumoral (231).

Une analyse comparative des transcriptomes entre les MW asymptomatiques et symptomatiques a été menée afin d'identifier des facteurs de progression tumorale dans cette hémopathie. L'équipe espagnole de B. Paiva n'a pas identifié de signature différenciant les formes indolentes des formes présentant des critères de traitement dans la MW (231). En revanche, une signature de 48 gènes a été récemment caractérisée, ce qui a permis d'identifier et de modéliser la surexpression de *BACH2* comme facteur de progression entre les MW de présentation asymptomatique et symptomatique (117).

L'impact transcriptionnel des principales anomalies cytogénétiques ou génomiques de la MW est en cours d'étude. Initialement, la signature transcriptionnelle des MW a été décrite comme indépendante de la présence de la délétion 6q (65). Une analyse récente par GSEA (*Gene set expression analysis*) a suggéré une dérégulation des gènes localisés dans les zones minimales délétées en 6q et en 4q dans une étude préliminaire (248). Récemment, l'analyse de transcriptome par RNA-Seq ou séquençage aléatoire du transcriptome à haut débit a permis de montrer l'existence d'une signature pour les MW avec amplifications 3q, trisomies 4 et délétions 6q comprenant respectivement 11, 776 et 65 gènes (132).

Au total, les analyses en transcriptome ont permis de caractériser des signatures transcriptionnelles associées à la MW et de mettre en évidence l'existence de la dérégulation de l'expression de différentes voies de signalisation intracellulaire ou de modification des interfaces fonctionnelles entre la cellule tumorale et son microenvironnement.

Tableau 7 B : Analyse comparative des stratégies d'études du transcriptome dans la MW (65, 110, 132, 231)

	Chng <i>et al</i> (Blood, 2006)	Gutierrez <i>et al</i> (Leukemia, 2007)	Paiva <i>et al</i> (Blood, 2016)	Hunter <i>et al</i> (Blood, 2016)
Effectif de MW	23	10	10	57
Technique	<i>Genome U133a microarray (Affymetrix)</i>	<i>Genome U133a microarray (Affymetrix)</i>	<i>Human Gene 1.0 ST array (Affymetrix)</i>	<i>RNA Seq (Illumina)</i>
Population cellulaire de référence	Plasmocytes normaux (n=15) Lymphocytes CD19 (n=7) Sujets sains	Plasmocytes normaux (n=5) Lymphocytes CD19 (n=8) Sujets sains	Lymphocytes B: CD25-CD22+ (n=9) CD22low CD25+ (n=8) Sujets sains	Lymphocytes B : CD19+ CD27+ (n=9) CD19+ CD27- (n=9) Sujets sains
Sélection	Sélection positive (CD19 et/ou CD138+)	Cytométrie de flux	Cytométrie de flux	Tri immunomagnétique
Comparaison	8 LLC 101 MM 25 smoldering MM	11 LLC 12 MM	4 MGUS IgM 4 MW Asymptomatiques 6 MW Symptomatiques	Statut mutationnel <i>MYD88L265P/CXCR4</i> : 52 MW <i>MYD88 L265P</i> 23 MW <i>CXCR4 Muté</i>

B. L'analyse des microARN

Les microARN (ou miARN) sont de petits acides ribonucléiques (ARN) simple brin non codantes qui jouent un rôle de régulateurs post transcriptionnels impliqués dans la régulation négative de l'expression des gènes. L'interaction entre le miARN et ses gènes cibles conduit à la dégradation de l'ARN messenger ou à une répression traductionnelle (210).

Une signature spécifique de la MW a été identifiée par l'analyse du profil d'expression des miARN dans la MW par puces. Une augmentation de l'expression des miARN 184, 206, 363, 494 et 542-3p ainsi qu'une diminution de l'expression du miARN 9 ont été mises en évidence (256). Une dérégulation de l'expression du miARN 155 a été observée dans la MW. Ce miARN a été étudié dans plusieurs modèles d'hémopathies lymphoïdes (210). Dans la MW, l'augmentation du miARN 155 participerait à la dérégulation de la prolifération cellulaire dans la MW en inhibant les voies de signalisation PI3K/AKT, MAPK/ERK, et NFκB et en modulant l'interaction des cellules tumorales avec les cellules stromales (256, 328). Un défaut d'expression des membres proapoptotique de la famille Bcl2 est observé dans la MW (96). Le miARN 155 contribue aussi à la régulation de l'expression de Bim et du facteur de transcription FOXO3a modulant ainsi l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Ces différents événements pourraient contribuer à un état de chimiorésistance des cellules tumorales à l'apoptose induite par certains agents thérapeutiques (96).

L'expression du miARN 206 est augmentée dans la MW. Une diminution du miARN 9 est en revanche observée. Les HATs (histone acétyltransférases) et les HDACs (histone désacétylases) sont respectivement les cibles potentielles de ces miARN, ce qui suggère une implication possible de certains miRNA dans la régulation de l'acétylation des histones impliquée dans les mécanismes de survie et de prolifération cellulaire dans le MW associés la progression de la MW (257). Une association entre la dérégulation de l'expression de ces différents miARN avec des facteurs pronostiques tels qu'une élévation de la $\beta 2$ ou un IPSSWM élevé a été observée (257). Toutefois, la valeur pronostique clinique de ces marqueurs n'a pas été étudiée dans de grandes cohortes de patients.

Une stratégie différente d'analyse basée sur l'étude différentielle des profils d'expression des miARN des lymphocytes B et des plasmocytes isolés respectivement de MW, LLC et MM a permis de montrer une régulation négative de l'expression des miARN-9*/152/182 et une surexpression des miARN-21/125b/181a/193b/223/363 (125). Toutefois, la MW se caractérise par une forte hétérogénéité des profils d'expression des miARN qui s'apparentent soit à la signature observée dans le LLC, soit à celle des MM et soit à celles des lymphocytes B normaux. L'existence du *continuum* lymphoplasmocytaire caractéristique de la MW peut en partie expliquer ces variations «phénotypiques». Toutefois, une régulation négative du niveau de l'expression du miARN 152 est observée dans la MW par rapport aux lymphocytes B. Le gène *Jak1*, impliqué dans la voie JAK/STAT, constitue l'une de ces cibles potentielles. Une surexpression des miARN 125b et 181a,

potentiellement impliqués dans le processus de différenciation plasmocytaire, est observée dans la MW par rapport à la LLC (125). *PDRM1* qui code pour la protéine BLIMP1, *IRF4*, *IL6R* et *PAX5* figurent parmi les gènes cibles de ces miARN. La coexpression d'IRF4 et de BLIMP1 est essentielle dans le processus de différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. Une dérégulation de l'expression d'IRF4 et de BLIMP1 a été mise en évidence dans la MW (65, 110). Enfin, l'analyse différentielle de la signature de la MW et du MM a confirmé la régulation négative du miARN9, potentiellement impliqué dans la régulation de l'expression de BLIMP1 dans la MW (125). Récemment, il a été montré aussi une modification du profil d'expression de mi ARN dans les sérums des MW. Ainsi, une augmentation des miARN 320a et 320b a été mise en évidence, une diminution de Let7a et de miARN-151-5p (30). La dérégulation du profil d'expression des miARN dans la MW pourrait participer à de nombreux processus physiopathologiques de la MW (210).

I.2.6 EPIGENETIQUE

La régulation épigénétique des suppresseurs de tumeur et des oncogènes joue un rôle important dans la physiopathologie de différentes hémopathies lymphoïdes B. Deux mécanismes principaux sont décrits : la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (86).

Le processus de méthylation de l'ADN contribue à la régulation de l'expression génique. Il se produit au niveau des cytosines qui précèdent une guanine, formant des dinucléotides appelés CpGs. Les îlots CpGs, c'est-à-dire les régions riches en CpGs, se situent le plus souvent au niveau des promoteurs des gènes. A l'état physiologique, ces îlots ne sont pas méthylés. Deux mécanismes sont décrits : l'hypométhylation et l'hyperméthylation. Un état d'hyperméthylation peut être observé au niveau des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs ou de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, les interactions cellules à cellules, l'apoptose... Le profil d'hyperméthylation des îlots CpGs, ou méthylome, va être associé à une régulation du niveau d'expression de ces différents gènes et est considéré comme un événement oncogénétique majeur impliqué dans la physiopathologie de nombreux cancers (86).

Dans la MW, les études de l'épigénétique sont peu nombreuses. Toutefois, plusieurs cibles, le plus souvent caractérisées dans d'autres modèles, ont été étudiées : *p16*, *DLC-1*(*deleted in liver cancer 1*), *SOCS1* et *SOCS3* (188, 244, 332, 333). Aucune méthylation du gène *p16/INKa* n'a été mise en évidence dans une étude de 8 patients atteints de MW (188). Dans les lignées cellulaires modèles, le 5-Azacytidine, un agent déméthylant, exerce une action cytotoxique dose-dépendante (333). Une inactivation par hyperméthylation du promoteur du gène *DLC-1* est observée dans la MW (332). Une hétérogénéité des profils d'expression de *SOCS1* et *SOCS3*, des régulateurs de la réponse intracellulaire médiée par l'IL6, est décrite dans la MW. Toutefois, la méthylation des promoteurs des gènes *SOCS1* et *SOCS3*, étudiée par *PCR* méthylation spécifique, n'est pas impliquée dans ces

variations de niveaux d'expression transcriptionnels (244). L'exploration de la zone minimale délétée en 13q a conduit à évaluer l'incidence des phénomènes de méthylation de *DLEU7*, un inhibiteur de la voie NFκB. Une hyperméthylation partielle de *DLEU7* est observée dans la MW (248). Récemment, une méthylation partielle des gènes suppresseurs de tumeur *WNK2* et *PRDM5* a été rapportée dans la MW : le rôle fonctionnel de ces altérations restent à caractériser même si ce profil est préférentiellement observé dans le groupe des MW *MYD88^{WT}* (132).

Le profil d'acétylation des histones est souvent dérégulé dans les hémopathies malignes. Une hyperacétylation est associée à une chromatine décondensée et à une activation de la transcription, une hypoacétylation à une chromatine condensée qui conduit à une répression de la transcription. Différentes enzymes, les HDACs et les HATs participent à l'homéostasie du processus (86). Une dérégulation de la balance des HDAC et des HAT est observée dans la MW. Ainsi, une augmentation de l'expression des HDACs qui régulent négativement la transcription génique et induisent la prolifération et la survie cellulaire est rapportée dans la MW (264). Les microARN contribueraient à la dérégulation de la balance HDAC/HAT dans la MW (257, 264).

I.2.7 L'ORIGINE DES CELLULES TUMORALES DE LA MW

Malgré les avancées considérables réalisées ces dernières années, l'origine cellulaire du clone tumoral dans la MW reste à définir. L'implication d'une stimulation antigénique dans le processus oncogénique est évoquée. En effet, des études menées dans des pays différents ont montré une augmentation du risque de survenue de MW en cas de récurrence de maladies infectieuses ou de maladies autoimmunes, ce qui suggérerait l'existence d'un lien entre MW et contexte de stimulation du système immunitaire (111, 147, 153, 154). L'analyse du statut mutationnel des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgVH) a rapporté une hypermutation des gènes *VH* dans environ 90 % des cas de MW (93, 192). L'étude du répertoire montre un biais d'utilisation avec une surexpression de la famille VH3 et en particulier du VH3-23. La mise en évidence d'un CDR3 court et de marqueurs d'une pression de sélection a été aussi décrite dans la MW (93).

Un profil immunophénotypique de type CD19+CD22^{low}CD25⁺CD27⁺ caractériserait les cellules tumorales de MW (138, 230, 231). L'analyse différentielle du profil en transcriptome a considérée les cellules B activées CD25^{low}CD22⁺ comme contrepartie « normale » de la MW (231). Toutefois, une signature de 57 gènes distingue les cellules tumorales des cellules B CD22^{low}CD25⁺ (231). Une comparaison du transcriptome des MW avec des lymphocytes B normaux et de lymphocytes mémoires CD27⁺ a montré l'existence d'une signature caractérisant les MW (132).

Le CD27 est un récepteur de la famille des récepteurs du TNF (*tumor necrosis factor*) qui est exprimé par le lymphocyte B après une phase de stimulation antigénique. Le CD27 interagit avec le CD70 pour participer au processus de différenciation des lymphocytes B matures en plasmocytes

(287). Cet antigène est considéré comme un marqueur de cellules B mémoires dont dérive probablement la cellule tumorale de MW (231, 284). En revanche, un profil d'expression hétérogène du CD27 est observé dans la MW (138, 246). Le clivage du CD27 membranaire conduit à la formation d'une forme soluble fonctionnellement active. Ce CD27 soluble peut interagir avec les mastocytes au niveau de la moelle osseuse pour réguler positivement des activateurs des cellules B et des facteurs de survie pour les cellules tumorales tels que CD40L et APRIL (329). L'ensemble de ces interactions pourrait contribuer au processus de différenciation lymphoplasmocytaire du clone tumoral.

Dans la MW, des anomalies dans le profil d'expression de différents gènes impliqués dans l'étape de différenciation terminale des lymphocytes B en plasmocytes ont été rapportées : *IRF4*, *PRDM1*, *PAX5*, *BACH2*, *XBPI-ERN1 α* (132, 171, 330). Une surexpression des gènes impliqués dans la recombinaison VDJ (*RAG1*, *RAG2*,...) et une diminution de l'expression *AICDA* (*activation-induced cytidine deaminase*), impliqué dans le processus de commutation de classe. De même, une augmentation significative de *SPIB* et *POU2F2* associée à une diminution d'*ID2* par rapport aux cellules B normales a été mise en évidence (330). Une hiérarchie moléculaire s'établirait donc entre *POU2F2*, *SPIB* et *ID2* au cours de la différenciation lymphocytaire B : l'expression aberrante de ces facteurs de transcription pourrait jouer un rôle important dans le blocage de la différenciation plasmocytaire dans la MW (330).

L'origine du clone malin de la MW pourrait donc être un lymphocyte B mémoire IgM + et/ou IgM+IgD+ bloqué dans son processus de maturation, après l'hypermutation somatique dans le centre germinatif mais avant la différenciation terminale en plasmocyte (Figure 8B). Cette cellule présenterait un déficit dans le processus d'initiation du *switch* isotypique (267). A l'issue de leur différenciation, les cellules tumorales restent en effet bloquées au stade précédent la commutation isotypique : celle-ci ne peut être induite même en cas de co-stimulation de la voie CD40/CD40 ligand (17, 150, 151). Les cellules tumorales, bien que possédant la « machinerie » nécessaire, ne sont pas en mesure d'enclencher le programme de la commutation de classe (150, 151). Cette configuration suggérerait donc l'existence d'une anomalie moléculaire bloquant le *switch* isotypique ou que la transformation tumorale d'une sous population de lymphocytes B insensible à l'environnement du centre germinatif ou ayant échappé à celui-ci. Toutefois, il a été montré l'existence de rares patients ne présentant pas d'hypermutation somatique des gènes *VH* (192). De même, des variations intraclonales du statut mutationnel des gènes *VH* ont été démontrées non seulement entre le compartiment des cellules tumorales sanguines et médullaires mais aussi au sein du compartiment des cellules tumorales sanguines (152). Ces données suggéreraient donc, qu'après la survenue de l'événement transformant, puisse se poursuivre le processus d'hypermutation somatique des gènes *VH* ce qui se traduirait par cette hétérogénéité intraclonale des cellules de MW. Le rôle d'une stimulation antigénique susceptible d'engager le BCR de la cellule tumorale et d'activer un programme de prolifération ou de survie cellulaire pourrait être ainsi évoqué (17, 267).

L'ensemble de ces scénarios partent de l'hypothèse d'un ou plusieurs évènements oncogéniques survenant dans une cellule B « mature » (Figure 9). La mutation *MYD88L265P* est observée principalement dans le clone dominant dans la MW et la LLC (132, 161). Toutefois, dans différents syndromes lymphoprolifératifs chroniques comme la LLC ou la leucémie à tricholeucocytes, il a été montré l'existence de mutations activatrices au sein de la population des cellules souches CD34+ (66, 72). De même, ces progéniteurs CD34+CD19+ présentant ces mutations acquises non passagères sont capables de se différencier *in vitro*. Dans ces modèles, l'analyse comparative des variants somatiques a montré la présence de mutations communes dans différentes sous populations cellulaires B tumorales et non B (CD3, CD14,..). Le développement d'un syndrome lymphoprolifératif B à partir d'une phase préleucémique a ainsi été évoqué. L'hypothèse d'une hématopoïèse pré-clonale ne peut donc être exclue dans la MW (97, 143).

Figure 8B : Schéma de la Lymphopoïèse B. Les marqueurs immunophénotypiques le plus discriminants à chaque étape de différenciation sont indiqués à chaque stade. Les compartiments centraux et périphériques de la lymphopoïèse B sont mentionnés. *Blood*, compartiment sanguin, *Bone marrow*, MO, *Spleen*, rate, *Lymph node*, ganglion. Fo B cell, *follicular B cell* ; GC, centre germinatif ; mem B, lymphocytes B mémoires ; MZB cell, cellule B de la zone marginale ; Pbl, plasmablast ; Trans or transit, lymphocyte B transitionnel. (314B)

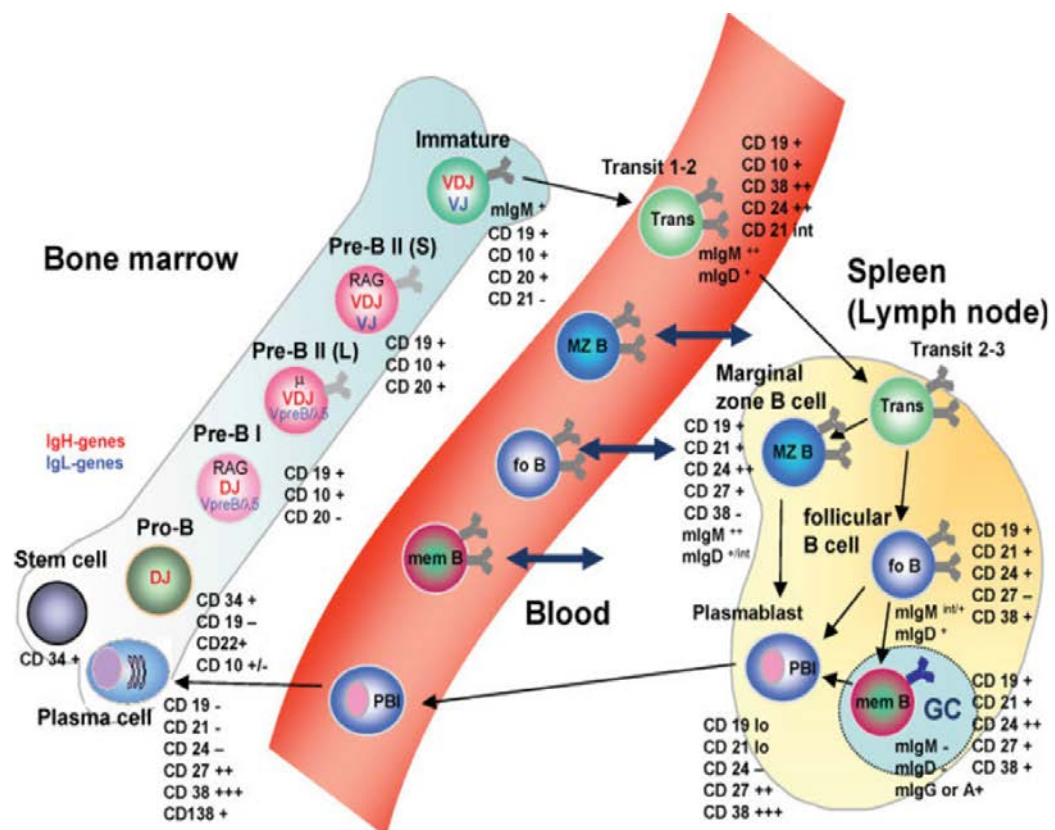
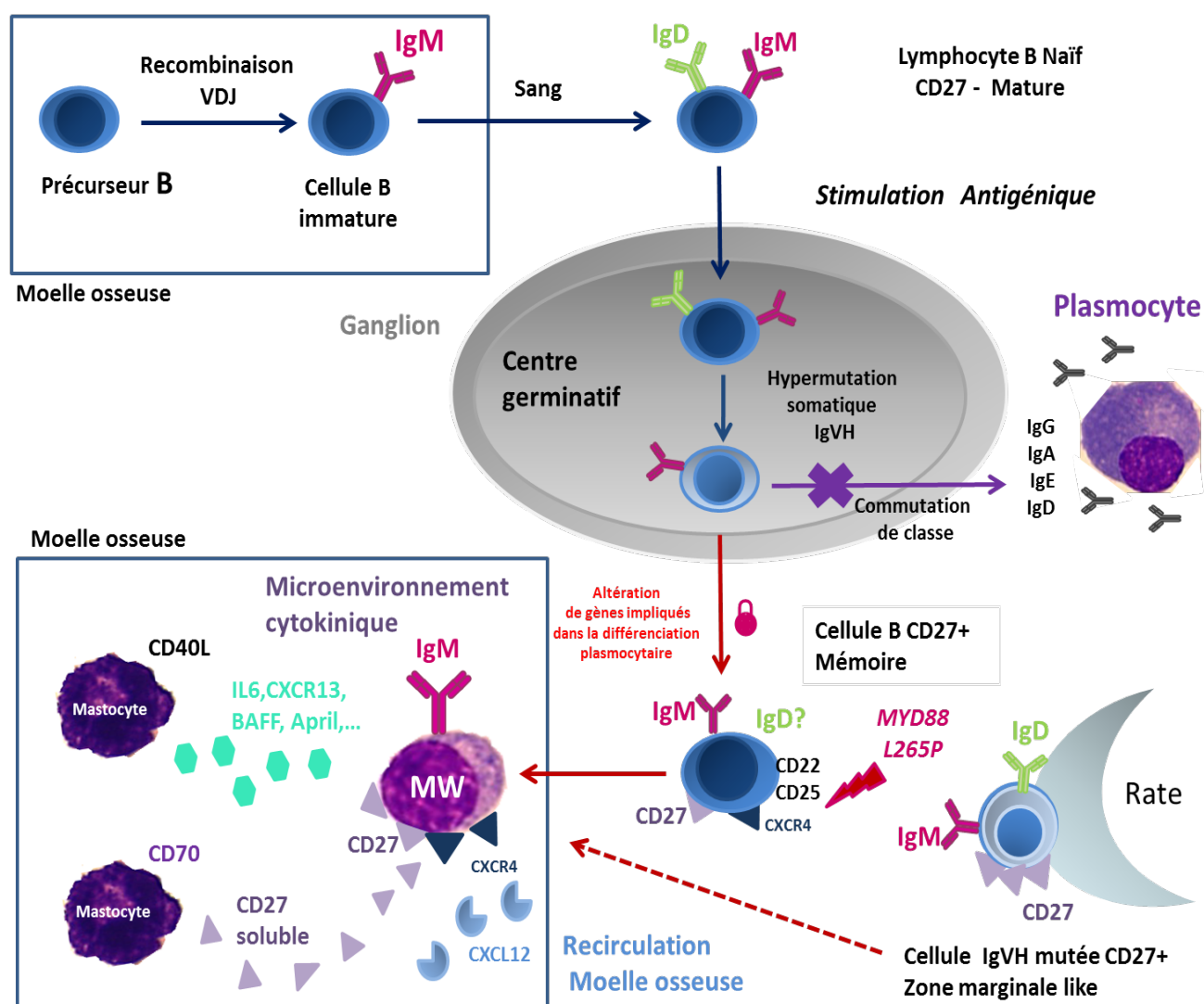


Figure 9 : Origine de la cellule de la Maladie de Waldenström : la cellule tumorale de la MW pourrait avoir comme origine un précurseur « mémoire-like » après hypermutation somatique des gènes *IgVH* suite à une stimulation antigénique. L'origine de ce précurseur mémoire pourrait être une cellule B mémoire à isotype simple (IgM) issue du centre germinatif ou une cellule « zone marginale-like ». Une altération de processus de commutation de classe et une dérégulation de l'expression de différents gènes ou facteurs de transcription impliqués dans la différenciation plasmocytaire favoriseraient l'émergence d'une cellule aux caractéristiques lymphoplasmocytaires. Différents événements génétiques comme la survenue de la mutation *MYD88L265P* contribueraient à l'expansion du clone. Le microenvironnement médullaire favoriserait une interaction fonctionnelle entre les mastocytes et les cellules tumorales pourrait s'établir (axe CXCR4/CXCL12, voie du CD27/CD70, cocktail cytokinique médullaire,...) contribuant ainsi l'expansion du clone tumoral de la MW dans la MO. Un phénomène de *shedding* pourrait conduire à une diminution du niveau de l'expression du CD27, libérant ainsi une forme soluble active.



I.2.8 MGUS- IGM : DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL OU STADE PRE WALDENSTRÖM ?

La présence d'une MGUS-IgM peut être identifiée plusieurs années avant le diagnostic de macroglobulinémie de Waldenström (157, 158). Un clone B de type MW (CD22^{low}/CD25/CD27+/IgM+) et des plasmocytes clonaux peuvent être mis en évidence dès le stade MGUS-IgM (231). La transition du stade MGUS-IgM au stade de MW symptomatique s'accompagne d'une augmentation de la proportion et du nombre des cellules clonales au sein de la moelle osseuse. Parallèlement, une modification du profil d'expression de différents marqueurs tels que le CD23, CD25 et CD27 au niveau du clone est mis en évidence (230).

Initialement, l'étude du statut mutationnel des gènes *Vh* avait décrit l'absence de réarrangement de la famille *Vh3-23* dans une cohorte de 8 MGUS-IgM (192). Une étude récente d'une cohorte de 64 MGUS-IgM n'a pas montré de différence significative de répartition des différents types de réarrangements des gènes *Vh* dans la MW et les MGUS-IgM. L'hypothèse de l'existence d'une population clonale commune à ces deux stades pourrait donc être émise (235, 306).

Une signature transcriptionnelle comprenant 151 gènes et 51 gènes a été identifiée lors de la comparaison des transcriptomes des cellules CD19+ et 138 + isolées de MW et de MGUS-IgM (304). Une dérégulation de gènes impliqués dans l'activation de la voie de signalisation AKT et MAPK est observée parmi lesquels figurent *DUSP22* et *TNFRSF10A*. En revanche, il n'a pas été mis en évidence de signature entre MGUS-IgM et les MW lorsque l'analyse est réalisée à partir des cellules B triées selon leur profil CD22/CD25 (231). Les effectifs restreints de patients atteints de MGUS-IgM inclus et les différences de stratégie de sélection des cellules tumorales et d'analyse peuvent expliquer ces résultats discordants (231, 304).

La mutation *MYD88L265P* est observée dans environ la moitié des cas de MGUS-IgM (305, 334). Ce variant pourrait donc constituer un événement initiateur précoce dans la MW (87). La mutation *MYD88L265P* est identifiée à la fois dans les cellules B isolées dans le sang et dans la moelle osseuse de ces patients avec MGUS-IgM (334). Toutefois, la « charge mutationnelle » dans le compartiment sanguin est plus faible que celle observée dans les MW (334). Le risque d'évolution de la MGUS-IgM en MW pourrait être associé à un pic monoclonal IgM plus élevé et à la présence de la mutation *MYD88L265P* (305). D'autre part, la survenue de MW avec mutation *MYD88L265P* a été décrite dans certaines MGUS-IgM sans mutation *MYD88L265P* (305, 305B). Une variation du profil mutationnel de *MYD88L265P* ne peut donc être exclue lors de la progression de la phase MGUS-IgM à celle de MW symptomatique. D'autres mutations de *MYD88* pourraient être associées au stade MGUS-IgM (302). La mutation *CXCR4S338X* est mise en évidence dans environ 20% des cas (260, 335). En combinant les données issues du séquençage Sanger et de PCR allèle spécifique, l'étude de 2 cas de MGUS-IgM muté *MYD88L265P* a montré l'existence de mutation *CXCR4S338X* sous clonale (335). La relation fonctionnelle entre les mutations de *CXCR4* et *MYD88L265P* dans le processus de

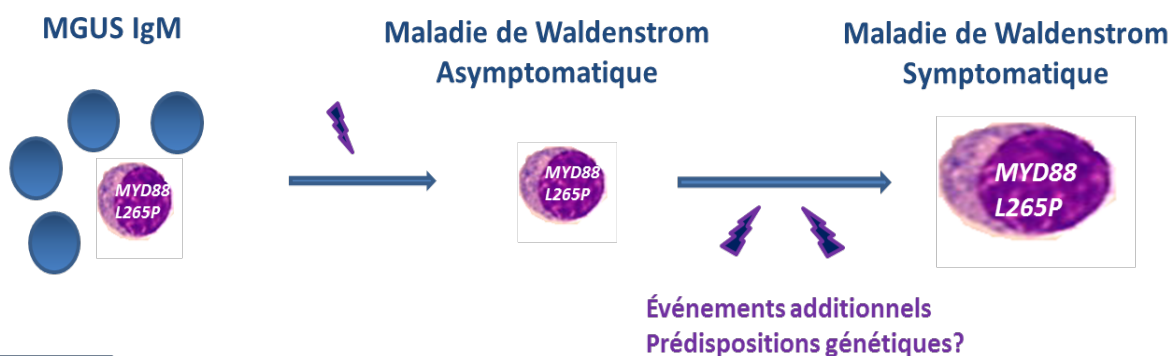
progression du stade MGUS vers celui de MW reste donc à explorer tout comme le profil mutationnel complet des MGUS.

Sur le plan des anomalies de structure, la première étude réalisée en FISH sur ces cellules B triées n'avait pas mis en évidence de délétion 6q dans les MGUS-IgM (274). Cependant, les études génomiques par puces à SNP, réalisée dans une cohorte de 11 patients, ont permis de détecter des gains et des délétions dès le stade des MGUS-IgM dans 36% des cas ainsi que des pertes d'hétérozygotie en l'absence de variation du nombre de copie (231). Ainsi, la délétion 6q ou les gains en 18q peuvent être observés dès le stade MGUS- IgM (231). Toutefois, la trisomie 4 et la trisomie 12 sont uniquement mises en évidence dans les MW. La complexité génomique analysée en puce à SNP augmente du stade MGUS-IgM à celui de Maladie de Waldenström, ce qui suggère le rôle d'une instabilité génomique dans cette évolution clinique (231).

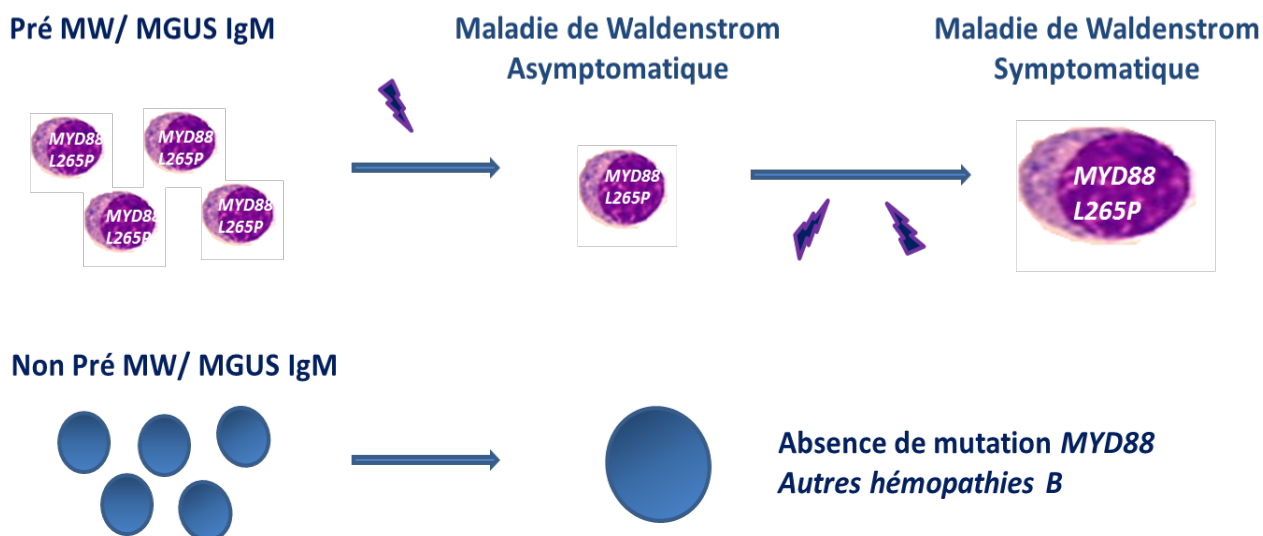
L'ensemble de ces données montre une certaine hétérogénéité génomique des MGUS-IgM ce qui pose la question de l'existence de différents sous groupes de MGUS-IgM. La révision de la classification OMS a toutefois séparé les MGUS-IgM des MGUS-IgA ou -IgG (286). Dès le stade MGUS-IgM, chez certains patients, des cellules tumorales B avec mutation *MYD88L265P* aux anomalies immunophénotypiques et génomiques comparables à la MW sont identifiées. La question d'une redéfinition du diagnostic différentiel MGUS-IgM/MW asymptomatique, qui est basée actuellement sur la mise en évidence d'un infiltrat lymphoïde B de plus de 10% à la biopsie ostéomédullaire, est donc posée (6). Les facteurs impliqués dans la progression clinique de la MGUS-IgM à la MW d'une phase asymptomatique ou symptomatique restent à explorer. Les principales hypothèses sont présentées dans la Figure 10.

Figure 10 : Hypothèses envisagées pour le rôle de la mutation *MYD88L265P* dans les MGUS-IgM et la pathogénèse de la MW (Adapté de Fonseca *et al.* (87)). **(Modèle A)** La mutation *MYD88L265P* est considérée comme un événement oncogénique majeur dans la progression de la MGUS-IgM vers la MW. *MYD88L265P*, étant une mutation activatrice qui confère un avantage prolifératif aux cellules mutées, conduit à l'émergence d'une population tumorale dominante définissant le stade MW. Des anomalies génomiques additionnelles favoriseraient la progression du clone vers le stade MW symptomatique. Une stimulation antigénique ou une prédisposition génétique pourraient favoriser l'évolution clinique du clone **(Modèle B)** Plusieurs sous-types de MGUS-IgM existent et la mutation *MYD88L265P* est identifiée dans le sous type qui a pour origine la MW. Différentes anomalies additionnelles favorisent la progression du clone MW (87, 231)

Modèle A



Modèle B



I.2.9 INTERACTION MICROENVIRONNEMENT ET CELLULES TUMORALES DANS LA MW

Une dérégulation du dialogue fonctionnel entre les cellules tumorales et le microenvironnement *via* les cytokines et les chémokines est décrite dans la MW au niveau de la niche médullaire.

A. Le concept de la niche médullaire

Le dialogue bidirectionnel cellules/ écosystème participe à la dynamique de la régulation de la prolifération cellulaire, du cycle cellulaire, ainsi que du trafic cellulaire (101). La MW est avant tout une hémopathie avec une infiltration tumorale au niveau de la moelle osseuse. Toutefois, des localisations extramédullaires de la maladie sont mises en évidence au niveau d'organes lymphoïdes comme les ganglions ou dans d'autres tissus (20, 180). Des cellules clonales de MW sont détectées dans le sang des patients ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de dissémination de la MO dont le rôle physiopathologique reste toutefois à définir (166, 334). L'existence d'une éventuelle hétérogénéité phénotypique, génomique et fonctionnelle des cellules tumorales selon leur localisation ne peut être exclue.

De nombreuses études ont évalué les relations du clone tumoral B avec le microenvironnement médullaire et ont permis de mettre en évidence des anomalies de régulation ou d'expression de différents acteurs impliqués dans la domiciliation et la migration des cellules malignes au sein de « niches » spécifiques. Ces niches contribueraient à la création d'un environnement protecteur pour la survie et la prolifération de ces cellules tumorales (101). Une dérégulation du profil d'expression de protéines impliquées dans le *homing* (CD11c, CD38, CD138, le CD49d, LFA1..) et la migration cellulaire (Rho/rac/cdc42) est observée dans la MW (113, 132, 215). La modification du profil d'expression des E-cadherines ou de FGFR3 participe au processus d'égression des cellules tumorales de la MO vers le sang et pourraient ainsi contribuer à une recirculation des cellules tumorales (14, 15). D'autres facteurs comme l'hypoxie, une altération de la matrice extracellulaire par dérégulation de l'expression des hyaluronanes synthétases ou la synthèse de métalloprotéases (MMP8,..) pourraient favoriser la dissémination et la colonisation de nouvelles niches médullaires par les cellules de MW (1, 14, 15, 211, 329). L'activation constitutive de différentes voies de signalisation intracellulaire comme AKT, PKC ou NFκB contribuerait aussi à la régulation du « *homing* » des cellules malignes dans la moelle osseuse et la survie des cellules tumorales au contact du microenvironnement dans la MW en modifiant les processus de migration et d'adhésion cellulaire (101, 168, 170, 202).

Le microenvironnement médullaire pourrait être aussi un terrain favorable à la présence d'autoantigènes ou d'antigènes microbiens stimulant le BCR et donc contribuer à l'expansion des

cellules tumorales comme dans d'autres modèles (36). Toutefois, l'implication d'aucun antigène n'a été identifiée spécifiquement dans la physiopathologie de la MW à ce jour (8).

L'ensemble de ces données suggérerait donc l'existence d'une interaction forte entre cellules tumorales et cellules du microenvironnement médullaire qui pourrait jouer un rôle essentiel dans la physiopathologie de la MW.

B. Le compartiment cellulaire

L'interaction des cellules tumorales avec les cellules stromales et endothéliales est essentielle à la prolifération et à la domiciliation cellulaire dans la MW et favoriserait l'émergence de résistance à différents agents thérapeutiques (fludarabine, bortézomib,...)(101). Cibler le microenvironnement tumoral pourrait donc constituer une nouvelle approche thérapeutique à envisager dans la MW comme cela a été initié dans d'autres hémopathies lymphoïdes. Différents agents pharmacologiques comme l'évérolimus exercent en effet leur activité antitumorale en modifiant les interactions adhésives des cellules tumorales avec les cellules stromales (259).

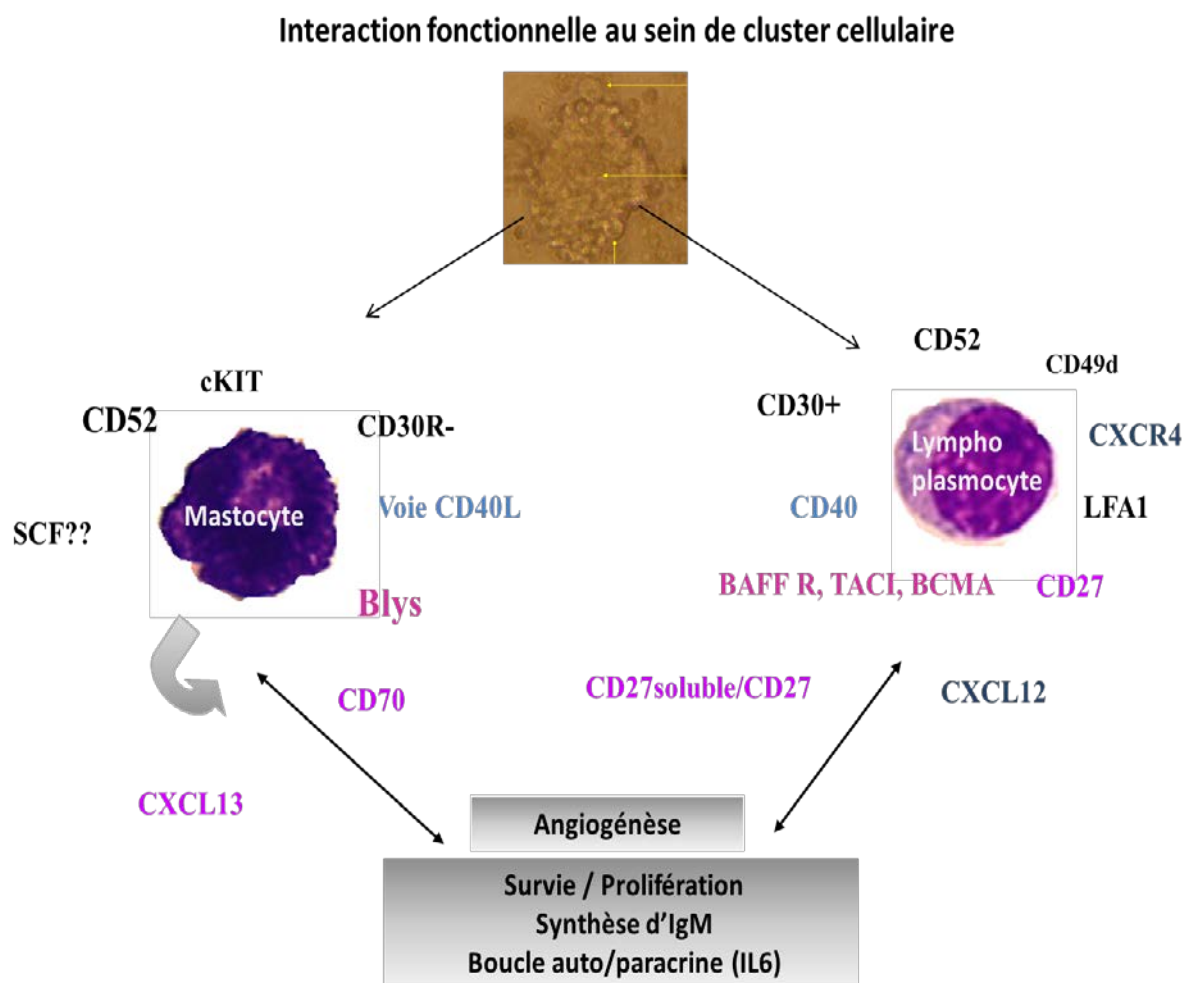
La densité des microvaisseaux de la moelle osseuse est augmentée dans 30-40 % des patients atteints de MW (2). Une augmentation du facteur Von Willebrand est rapportée dans la MW (120). Le ligand du récepteur tyrosine kinase Eph-B2 est fortement exprimé par les cellules endothéliales qui pourraient jouer un rôle dans la croissance tumorale (14). Des anomalies de l'angiogenèse sont donc observées dans la MW (291).

Une hyperexpression de CXCL13 par les cellules tumorales pourrait contribuer au recrutement des mastocytes (132). Les mastocytes, localisés dans la MO, joueraient un rôle de médiateur privilégié avec la cellule tumorale de MW par l'intermédiaire de la voie du CD40/CD40 ligand, de l'interaction du CD70 exprimé par le mastocyte et du CD27 soluble produit par les cellules malignes mais aussi par la sécrétion de VEGF (270, 275, 295). L'activation de ces voies participerait à la dérégulation de différentes voies de signalisation intracellulaire comme la voie ERK, qui participent à la prolifération et la survie du clone tumoral. Inhiber pharmacologiquement la voie du CD154/CD40 ou du CD70/CD27 diminue la viabilité et la prolifération des cellules MW. Mastocytes et cellules tumorales expriment respectivement récepteurs et ligands, vecteurs de communications homo/hétérotypiques contribuant à la régulation de l'angiogenèse, de la synthèse d'IL6 et de l'IgM. Dans la MW, une interaction fonctionnelle existe donc entre les cellules tumorales et les mastocytes (295) (Figure 11).

D'autre part, une perturbation de l'homéostasie lymphocytaire T est observée dans la MW. Une expansion de lymphocytes T CD8+CD57+ cytotoxiques peut être observée (166, 176). Le niveau d'expression du CD28 est diminué lorsqu'une augmentation de la perforine et du granzyme b est mise en évidence. La dérégulation de leur profil transcriptionnel et fonctionnel pourrait contribuer à modifier la réponse lymphocytaire anti-tumorale ou la réponse en terme de toxicité anticorps

dépendante dans un contexte d'immunothérapie (166). Ces différentes sous-populations lymphocytaires pourraient aussi participer à la sécrétion de différentes cytokines impliquées dans la physiopathologie de la MW (IL21,...) (126). L'expression de différentes molécules de surface, comme les molécules de costimulation du système B7, sont nécessaires à une interaction optimale entre les lymphocytes B et T (106, 239). Les cellules tumorales présentent un niveau d'expression anormale de différents marqueurs impliqués dans cette interaction avec les lymphocytes T comme le CD80 ou le CD86 (106, 132, 246). En revanche, il n'est pas décrit de mécanisme de trogocytose, c'est à dire de transfert de molécules entre 2 cellules en contact, dans la MW pour ces signaux de costimulation (42). Une augmentation de différentes formes solubles de molécules du HLA de classe 1 (HLA-G,...) est en revanche observée dans la MW (203). Ce profil pourrait favoriser l'échappement des cellules tumorales à la surveillance du système immunitaire en modulant la configuration de la synapse immunologique dans la MW (106, 239).

Figure 11 : Interaction fonctionnelle lymphoplasmocytes et mastocytes dans la MW



C. Le microenvironnement cytokinique

Les cytokines participent au dialogue fonctionnel entre cellules tumorales et microenvironnement au sein de la niche médullaire. Produits à la fois par les cellules tumorales (voie autocrine) et par le microenvironnement cellulaire (voie paracrine), le réseau cytokinique comprend des cytokines mais aussi des chémokines et des facteurs de croissance (3). L'interaction des cytokines avec leurs récepteurs entraîne l'activation de cascades de signaux intracellulaires parmi lesquels figure la voie d'activation des tyrosines kinases JAK et leurs cibles, les facteurs de transcription STAT (32, 252). Cette voie contribue donc à la régulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les processus de différenciation cellulaire, de prolifération, et d'apoptose (252). L'activation constitutive de la voie de signalisation JAK/STAT a été associée à la physiopathologie de plusieurs hémopathies lymphoïdes B (252). La dérégulation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire conduisant à la dérégulation du cycle cellulaire, l'augmentation de la survie et de la prolifération cellulaire (Ras/MAPK, PI3K/AKT/mTOR, PKC/NFκB) pourrait ainsi être partiellement associée à la dérégulation du profil cytokinique dans la MW (127, 168, 170, 259).

Le rôle de différents médiateurs a ainsi été décrit : l'IL6, l'IL21, CCL5, TNF-α, CD40, MIP-1α (*Macrophage Inflammatory Protein*), IL10, IL15, IGF1 (*insulin-like growth factor-1*) (83, 84, 85, 114, 132, 174, 291) ... Dans la MW, une dérégulation de l'homéostasie du réseau cytokinique est observée. Ces variations du taux d'expression de ces cytokines ont été rapportées à la fois au niveau du sang (IL6) et de la moelle osseuse (CXCL12) (114, 215). La dérégulation du profil de sécrétion de ces cytokines produites soit par les cellules accessoires soit par le clone tumoral, pourrait participer à la physiopathologie de la MW.

L'IL6 est une cytokine essentielle dans la physiopathologie de la MW. Une augmentation des taux sériques d'IL6 est observée et un niveau d'expression élevé d'IL6 est mis en évidence dans les cellules tumorales (110, 114, 231). L'IL6 est associée à l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire, notamment celle des MAPK (132, 168). Comme l'IGF1, elle participe à l'activation de la voie de signalisation AKT et contribuerait *in vitro* à la différenciation des cellules B dans la MW (174, 324). La mutation *MYD88L265P* induit l'expression de l'IL6 (7, 324).

Le microenvironnement cytokinique pourrait participer à la régulation de la synthèse de l'IgM par le clone tumoral. En effet, un lien fonctionnel entre IL-6, RANTES (ou CCL5) et la sécrétion d'IgM a été rapporté. CCL5 contribue à la stimulation de la sécrétion d'IL6 par les cellules stromales, ce qui va induire la sécrétion d'IgM par les cellules tumorales via l'activation de la voie JAK/STAT (83, 84, 85). BLyS (*B-lymphocyte stimulator*) (ou BAFF) est un membre de la famille du TNF. BLyS est surexprimé dans certaines hémopathies B et contribuerait à l'inhibition de l'apoptose des cellules tumorales (84, 85). Dans la MW, une augmentation de la sécrétion d'IgM par les cellules B malignes a été observée lors d'une exposition à BLyS en présence d'autres cytokines (IL-6, IL-10,...). Il a été

également démontré le rôle de l'IL21 dans la prolifération des cellules malignes et la sécrétion d'IgM. L'IL21 participe à l'activation de la voie de signalisation de STAT3 dont les cibles principales sont l'IL6 ou des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation plasmocytaire (126).

Des variations des taux des cytokines impliquées dans la régulation de l'angiogénèse ont été également décrites dans la MW. Une augmentation de l'expression du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), de l'angiogénine et de MIP-1 α (*Macrophage Inflammatory Protein*) ainsi qu'une diminution du ratio Ang-1/Ang-2 (Angiopoïétine) ont été observés dans cette hémopathie. Ces profils d'expression ont été associés à des facteurs pronostiques péjoratifs de la MW et à une forte masse tumorale ce qui suggérerait leur rôle dans la croissance cellulaire (2, 291).

Le microenvironnement tumoral délivre donc des signaux de survie et de domiciliation cellulaire aux cellules de MW. Cette liaison fonctionnelle qu'entretient la cellule tumorale avec son écosystème médullaire peut être toutefois considérée comme son « talon d'Achille ». Rompre ce dialogue pourrait constituer une cible pour de nouvelles thérapeutiques.

I.2.10 ALTERATION DE LA VOIE DU BCR DANS LA MALADIE DE WALDENSTRÖM :

A. Voie du BCR :

Les lymphocytes B jouent un rôle essentiel dans les processus de l'immunité acquise et en particulier lors de l'initiation de la réponse humorale. Le récepteur de la cellule B (BCR) est un acteur clé dans ces processus. Le BCR est un complexe formé du CD19, d'une immunoglobuline (Ig) membranaire, associé à un hétéro dimère constitué par le CD79A et le CD79B qui possèdent des domaines ITAM (immunoglobulin tyrosine-based activation motif) intracytoplasmiques essentiels à la transduction des signaux induits par le BCR. Deux modèles d'activation du BCR sont décrits : activation par l'antigène ou activation indépendante de l'antigène dite « tonique » impliquant la voie PI3K/AKT/mTOR. La signalisation de type « tonique » est continue et permet la survie de la cellule B normale sans stimulation antigénique (325, 326) (Figure 12).

La reconnaissance d'un antigène spécifique par les domaines variables de l'Ig entraîne l'agrégation des BCR qui induit la transduction du signal (36, 325, 326). En effet, l'agrégation des BCR par des antigènes multivalents permet la mise en contact des séquences ITAM phosphorylées du CD79A et du CD79B avec des PTK (Protéines Tyrosine Kinases) de la famille Src ce qui induit la translocation cytoplasme / membrane de SYK. La voie Ras et la phospholipase C (PLC) γ 2 sont alors activées. La liaison au BCR ou « *cross linking* » entraîne donc le recrutement *in fine* de molécules de signalisation qui appartiennent à au moins 3 familles de PTK :

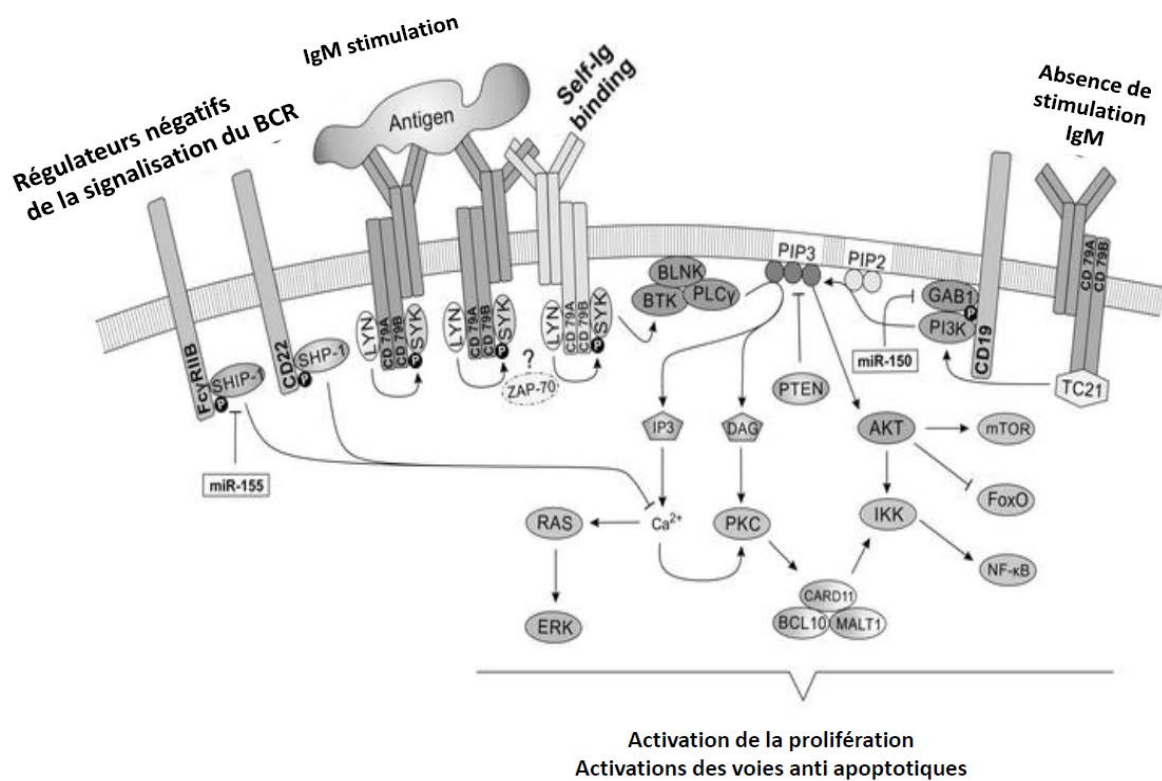
- les kinases de la famille Src (Lyn, Btk, Fyn et Lck) qui présentent un part de redondance fonctionnelle
- les kinases de la famille p 72 SYK/ ZAP70
- les kinases de la famille Tec.

La BTK appartient à la famille des Tec et constitue l'un des effecteurs proximal du BCR. L'interaction d'un antigène avec le BCR induit la phosphorylation d'une tyrosine de la BTK et augmente son activité kinase (240, 277).

L'activation du BCR dans un lymphocyte B enclenche donc une cascade d'évènements conduisant à une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et à l'activation enzymatique de différentes kinases et la phosphorylation de médiateurs, ce qui aboutit à la transduction du signal via différentes voies de signalisation intracellulaires telles que ERK 1/2 ou AKT. L'engagement du BCR active *in fine* différents acteurs qui contribuent à la régulation de la voie NFκB (36, 277). L'ensemble des voies d'activation cellulaire sous-jacentes au BCR participent au contrôle de nombreux processus cellulaires essentiels aux lymphocytes B normaux et pathologiques comme la survie, la prolifération, l'apoptose et la différenciation cellulaire.

Au cours de la lymphopoïèse B, l'activation du BCR varie en fonction du stade de différenciation et de l'environnement de la cellule B. Une activation chronique du BCR pourrait ainsi enclencher des signaux de survie et de prolifération favorisant l'émergence d'une population tumorale. L'interaction de la cellule tumorale avec son microenvironnement peut être modifiée par la modulation des processus d'adhésion et de communication cellulaire médiés par les cytokines. L'analyse fonctionnelle de la réponse à l'engagement du BCR joue donc un rôle essentiel dans la compréhension de la lymphomagenèse (325).

Figure 12 : Activation de la voie du BCR (277). La voie du BCR peut être engagée après stimulation par un antigène ou par *self Ig-binding*. Une activation dite « tonique » médiée par le recrutement de PI3K est présentée à droite de la figure. Dans une cellule B, l'initiation, l'amplitude et la durée de l'activation du BCR peuvent être modulés par la structure spécifique de l'immunoglobuline, les protéines adaptatrices (comme GAB1, BLNK, GRB2, CARD11), l'activité de différentes kinases (LYN, SYK, PI3K) ou des phosphatases (SHIP-1, SHP-1 et PTEN) et le niveau d'expression de micro ARN (miR-155, miR-150). Le BCR participe à l'activation de différentes voies en amont telles que PI3K/AKT, NF- κ B or ERK/MAPK, qui contribuent à la régulation des signaux de survie et de prolifération cellulaire.



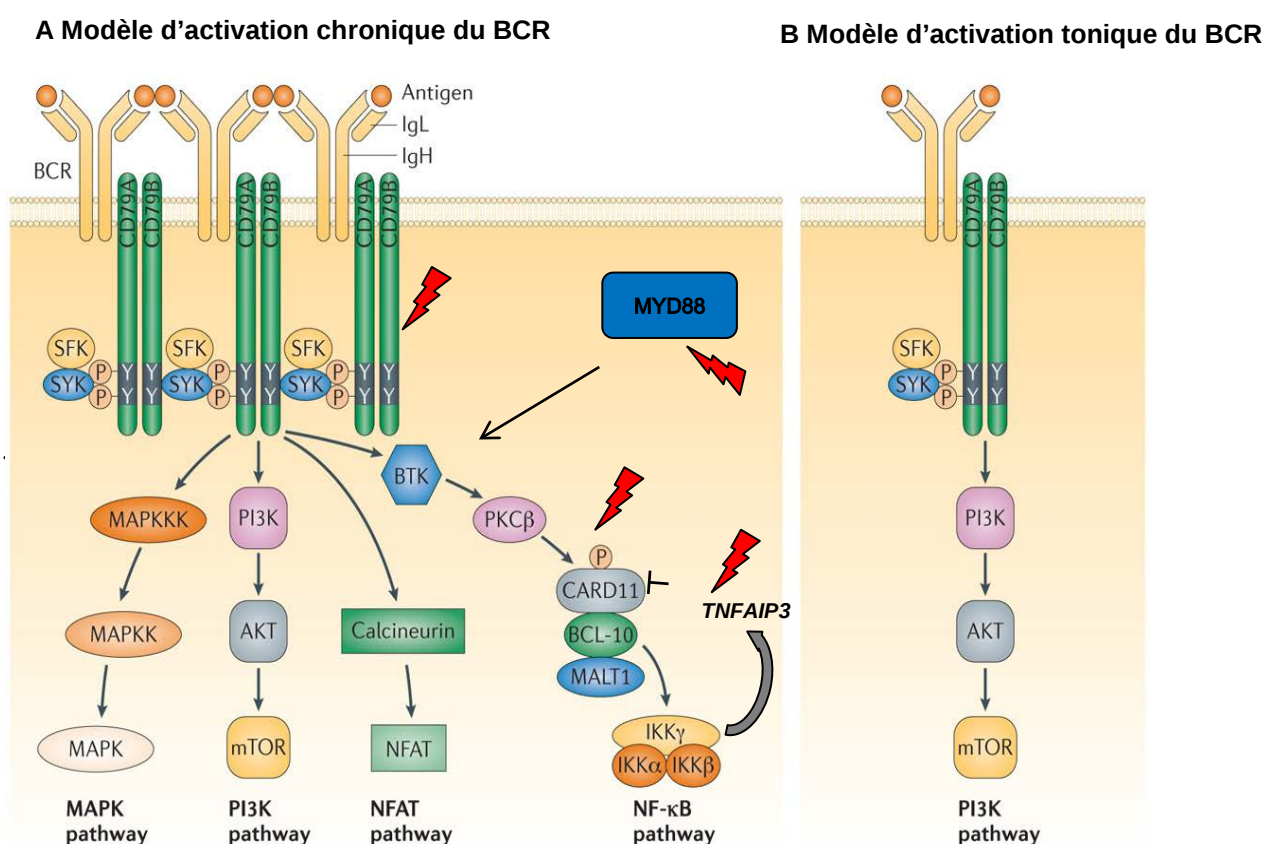
B. Voie du BCR et Maladie de Waldenström

Alors que la caractérisation fonctionnelle de la voie du BCR dans différentes hémopathies lymphoïdes B a été menée, les données dans la Maladie de Waldenström étaient jusqu'à très récemment parcellaires (325) (Figure 13).

Figure 13 : Présentation de différents modèles d'activation de la voie du BCR (Adapté de (325), et (326)). **A :** Le modèle d'activation dite chronique du BCR dans les DLBCL de type ABC conduit à engagement de multiples voies de signalisation parmi lesquelles figurent NFκB. Dans une cellule B normale, c'est la liaison de l'antigène au BCR qui active ce profil. **B :** Dans le modèle d'activation dite « tonique » décrit dans les lymphomes de Burkitt, c'est principalement la voie PI3K qui est activée, l'antigène ne joue pas de rôle prépondérant dans la modulation de l'activation du BCR.

IgH : chaîne lourde des immunoglobulines. IgL : chaîne légère des immunoglobulines.

Les flèches rouges indiquent la présence de mutations qui pourraient contribuer à la dérégulation de la signalisation du BCR dans les DLBCL de type ABC.



L'implication d'une stimulation antigénique dans la physiopathologie de la MW a été suggérée au regard du répertoire biaisé des réarrangements des gènes *IgVH* (93, 192). Les études en transcriptome ont par ailleurs montré une dérégulation du profil d'expression de différents acteurs de la voie du BCR comme la tyrosine kinase *SYK* ou du *CD79B* (65, 110, 132). Des mutations de type gain de fonction pourraient participer à l'activation du BCR. Les mutations de *SYK* dans la MW sont exceptionnelles (299). En revanche, des variants somatiques dans le domaine de régulation ITAM du *CD79A* et du *CD79B* ont été décrits dans la MW (248). L'impact fonctionnel des mutations en *CD79BY196* a été modélisée dans les DLBCL de type ABC (73). L'expression du *CD79A* ou du *CD79B* est nécessaire pour la survie des cellules tumorales des DLBCL-ABC. Les mutations du BCR sont associées à l'augmentation de l'expression du BCR membranaire des cellules tumorales. Elles participent aussi à l'abolition de la répression exercée par les kinases inhibitrices Lyn (73).

Récemment, il a été montré que les cellules primaires de MW présentent une activation constitutive de la signalisation du BCR (10). En effet, en l'absence de stimulation exogène, une augmentation de la phosphorylation de différents acteurs de la signalisation du BCR comme *SYK*, *BLNK*, *PLCγ2*, *ERK* est observée. Une activation constitutive de *BTK* et de *Src* a été mise en évidence dans la MW (49, 160, 323). Cette signature s'observe dans le groupe des patients mutés *MYD88L265P* et en l'absence de mutations du *CD79A* et du *CD79B*. Dans des modèles pré cliniques de MW, l'inhibition pharmacologique de différents effecteurs en aval du BCR avec le dasatinib (inhibiteur de *LYN*), le fostamatinib (inhibiteur de *SYK*) ou l'enzastaurine (inhibiteur de *PKCβ*) exerce un effet anti tumoral dans la MW (10, 75, 160, 202). D'autre part, l'inhibition de l'activité de *Src* par l'*AZD0530* diminue la migration et la prolifération cellulaire (216). L'ensemble de ces données suggèrent l'implication de la voie du BCR dans la physiopathologie de la MW.

Les études d'engagement du BCR *in vitro* ont identifié 2 groupes de patients répondeurs dans la MW (10). Le premier groupe de patients, principalement symptomatique, présente un profil haut répondeur (réponse complète), le second groupe de MW un profil de réponse proche d'un lymphocyte B normal et plutôt observé dans le groupe des MW indolents. L'engagement du BCR n'induit alors qu'une hyper activation de *PLCγ2* et de *ERK* indépendante de *BTK* (10). Le profil de réponse d'une cellule tumorale à l'engagement du BCR résulte aussi de la balance d'expression de signaux d'activation et d'inhibition telle que le *CD22* ou *SHP-1* (277). Une augmentation de l'expression de l'IgM de surface, probablement due à des modifications post-translationnelles, associée à une diminution de l'activité phosphatase régulatrice du BCR est observée ce qui pourrait contribuer à une signalisation aberrante du BCR dans la MW (10, 231). Cette diversité de profil de réponse au BCR est sans doute à explorer afin de confirmer l'intérêt de cibler la voie du BCR dans les MW symptomatiques.

Toutefois, la signalisation du BCR est un labyrinthe constitué de différentes cascades de signalisation communicant entre elles (36). La question de la redondance fonctionnelle dans la propagation du signal du BCR est donc à envisager. En présence d'un inhibiteur de SYK, une diminution de l'activation de BTK, p44/p42 MAPK et d'AKT, d'autres voies de signalisation essentielles à la survie de la cellule tumorale est observée (160, 168, 232). BTK se situe au carrefour de différentes voies de signalisation intracellulaires et est constitutionnellement activé par le Myddosome dans les MW *MYD88L265P* (240, 323). Le profil d'activation de ERK et ou d'AKT n'est pas modifié en présence d'ibrutinib. L'idelalisib ne modifie pas le niveau d'activation de BTK (75). L'ensemble de ces données suggérerait que l'ibrutinib et l'idelalisib pourraient cibler une signalisation du BCR de type tonique et antigène dépendante dans la MW.

D'autre part, une interaction entre la voie du BCR et l'axe CXCL12/ CXCR4 a été montrée dans différents modèles et conduit à une activation de BTK (36, 64). L'inhibition pharmacologique par l'ibrutinib ou l'idelalisib entraîne une diminution des interactions adhésives entre les cellules tumorales et le microenvironnement dans la MW (75, 323). Toutefois ces agents, à la différence des inhibiteurs de Src, ne modifient pas le processus d'adhésion et de migration cellulaire associé à l'activation de la voie CXCR4 (215, 216). Même si ces données restent préliminaires, ces différents modèles d'exploration par inhibition pharmacologique suggèreraient l'existence d'un dialogue fonctionnel entre le Myddosome, les voies du BCR, et l'axe CXCL12/CXCR4 dans la MW.

II. OBJECTIF DE THESE

Mon projet de thèse a consisté à étudier le profil immunophénotypique, génomique et clinique des patients présentant une mutation du gène *CXCR4* dans la Maladie de Waldenström :

- Analyse du profil mutationnel de *CXCR4* par une approche de séquençage en NGS et séquençage Sanger
- Evaluation de l'incidence des mutations de *CXCR4* dans une cohorte de 98 patients atteints de MW
- Étude du panorama mutationnel associé de différentes voies de signalisation associées à *CXCR4*
- Description du profil génomique des mutations de *CXCR4* par puces à SNP
- Caractérisation du profil clinico biologique des patients selon le statut mutationnel de *CXCR4*

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Clinical Cancer Research* (Annexe n°1) et d'une revue générale publiée dans la collection FMC de la revue Hématologie « La Leucémie Lymphoïde Chronique et la maladie de Waldenström » coordonnée par le Pr Véronique Leblond sous l'égide de la Société Française d'Hématologie (Chapitre : Avancées biologiques dans la maladie de Waldenström) (Annexe n°2, en cours de publication).

III. MATERIEL ET METHODE

III.1 PATIENTS

Le recrutement des patients atteints de MW a été réalisé dans les services d'hématologie du Centre Hospitalier de Valenciennes et du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille.

Le diagnostic de MW a été établi selon les critères diagnostiques préconisés par *Second International workshop on Waldenström macroglobulinemia* (225, 226).

La cohorte est constituée de 98 patients :

- 63 hommes et 35 femmes non apparentés
- L'âge moyen au diagnostic est de 67 ans (36- 92 ans)
- Aucune forme familiale de MW n'a été incluse

Les données clinico-biologiques suivantes ont été renseignées dans une base de données pour l'analyse statistique en collaboration avec le Pr X Leleu (UMR-S 1172, IRCL et Service des Maladies du Sang, CHRU de Lille/ Service d'Hématologie Cellulaire, CHU de Poitiers).

Les données cliniques du suivi des patients étaient disponibles dans 93 cas.

- Données biologiques au diagnostic : hémogramme (numération des globules blancs, des lymphocytes, taux d'hémoglobine et numération plaquettaire), dosage du pic monoclonal IgM, taux de la β 2-microglobuline, recherche de cryoglobuline et d'agglutinines froides, test de Coombs direct, caryotype conventionnel et FISH (recherche de délétion 13q14, 11q23, 17p, 6q23, trisomie 4 et 12)
- Données cliniques : hépatomégalie, splénomégalie, adénopathies, pathologie liée à la présence de l'IgM, syndrome d'hyperviscosité, transformation en lymphome de haut grade
- Score IPSSWM (205)
- Traitement : type de traitement et date d'initiation du premier traitement
- Evolution clinique : statut et date de dernier suivi, date et cause de décès

Un traitement a été instauré au diagnostic de la MW chez 41% des patients.

La première ligne de traitement comportait du chloraminophène en monothérapie dans 12 cas, de la fludarabine dans 3 cas, du rituximab (R) en monothérapie dans 3 cas ou en association avec de la chimiothérapie dans 51 cas (R dexaméthasone-cyclophosphamide dans 19 cas, R-bortezomib-dexaméthasone dans 7 cas, R bendamustine dans 5 cas).

III.2 ISOLEMENT CELLULAIRE

III.2.1 ISOLEMENT DES CELLULES MONONUCLEEES

La technique d'isolement des cellules mononuclées (CMN) repose sur le principe de séparation par gradient de densité en milieu de séparation au Ficoll® (d =1,077). La moelle ou le sang prélevés sur un tube EDTA sont dilués volume à volume en RPMI 1640 (Sigma) préchauffé à 37°C. Cette suspension est délicatement déposée sur le milieu de séparation, en respectant les volumes suivants : 3 ml de Ficoll® (Eurobio) pour 6 ml de prélèvement dilué. Après centrifugation (2500 tours/min, à 20°C pendant 30 minutes), l'anneau des cellules mononuclées isolées au niveau de l'interface surnageant /milieu de séparation est récupéré. La suspension cellulaire recueillie est lavée en milieu RPMI puis une numération cellulaire est réalisée.

III.2.2 CRYOPRESERVATION EN AZOTE LIQUIDE

A. Cryopréservation en azote liquide

Un culot cellulaire (5 à 15 millions de cellules) est obtenu par centrifugation (2500 tours/min, pendant 5 min, à 4°C) à partir d'un volume de la suspension cellulaire dans des tubes à cryogénéisation. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est remis en suspension à la concentration finale de 10⁶ cellules pour 100 µl dans une solution de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio)/ 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma). Avant le stockage dans une cuve à azote liquide, les ampoules sont placées une nuit à -80°C.

B. Décongélation des CMN

Dès la sortie des ampoules de cryopréservation de la cuve à azote liquide, les cellules sont rapidement remises en suspension dans une solution de RPMI 1640/ 10% de SVF préchauffée à 37°C. Trois lavages sont effectués (2500 tours/min, à 4°C, 5 min). La numération cellulaire est effectuée sur la suspension cellulaire en PBS (Phosphate Buffer Saline). Une estimation de la viabilité cellulaire est réalisée par coloration au Bleu trypan par lecture en microscopie optique.

III.2.3 TRI CELLULAIRE IMMUNOMAGNETIQUE

Les prélèvements de MO ont été enrichis en cellules tumorales B grâce à une étape de tri immunomagnétique par sélection négative (*B-cell isolation kit II human*®, Miltenyi Biotec). Cette stratégie permet de retenir dans une colonne placée dans un aimant dans un champ magnétique

l'ensemble des cellules autres que les lymphocytes B, grâce à des billes magnétiques couplées à des anticorps ciblant différentes population cellulaires : anti CD2 (ciblant les lymphocytes *Natural killer* (NK) et T), CD43 (reconnaissent les polynucléaires et les lymphocytes T), CD16 (ciblant les monocytes et les lymphocytes NK), CD14 (reconnaissant les macrophages et les monocytes) et CD235a (un marqueur de la lignée érythroblastique, la glycophorine A).

Un culot de 10^7 cellules mononuclées est remis en suspension dans 80 μ l de tampon MACS[®] (Miltenyi Biotec) et incubé avec 20 μ l du cocktail d'anticorps pendant 10 min à 4°C puis avec les microbilles durant 15 minutes. Deux lavages successifs en tampon MACS[®] sont réalisés. La colonne de séparation cellulaire est imprégnée de 3 ml de tampon MACS[®]. A la fin de l'élution de la solution tampon, 500 μ l de la suspension cellulaire est déposé sur la colonne. L'éluat récupéré contient la fraction cellulaire d'intérêt. La solution tampon est éliminée par lavage en PBS. Une numération de la suspension cellulaire est ensuite réalisée. Des culots « secs » pour extraction d'ADN et des culots resuspendus dans 1 ml de TRIzol (Invitrogen) pour extraction de l'ARN sont préparés. Parallèlement, la pureté en cellules CD19⁺ de la suspension cellulaire triée est vérifiée par cytométrie en flux, grâce à la combinaison d'anticorps suivante qui évalue la clonalité et le pourcentage de cellules tumorales dans l'échantillon : κ , λ CD19, CD38, CD138, CD27 et CD2.

Une pureté de plus de 90% de cellules B a été obtenues dans tous les cas (moyenne : 95,8%).

Le kit Pan T (Miltenyi Biotec) est utilisé sur le même principe pour trier les lymphocytes T à partir de cellules mononuclées isolées à partir de sang périphérique.

III.3 EXTRACTION D'ADN

Le kit « QIAamp Tissue Kit » (Qiagen[®]) est utilisé pour extraire l'ADN à partir de culots secs réalisés après tri immunomagnétique selon les recommandations du fournisseur. La procédure d'extraction comprend la lyse des cellules par la protéinase K, le lysat est chargé sur la colonne Qiagen, l'ADN se fixe sur la membrane de la colonne pendant que les impuretés sont éliminées par deux lavages et centrifugations. L'éluat obtenu contient l'ADN.

Le dosage des concentrations et l'évaluation de la qualité d'ADN sont déterminés par mesure spectrophotométrique avec un Nanodrop ND-1000[®]. Le rapport des densités optiques (DO) 260 nm/DO 280 nm doit être compris entre 1,8 et 2.

Pour les études en NGS et les puces à SNP, un dosage par technique Dropsense ou au Picogreen[®] permettant une quantification spécifique de l'ADN double brin est réalisé.

Les ADN ainsi extraits et dosés sont ensuite conservés à -20°C.

III.4 ETUDE PAR SEQUENÇAGE DE NOUVELLE GENERATION

L'analyse a été effectuée à part d'ADN extraits de cellules tumorales triées à partir de prélèvement de MO et d'ADN non tumoral obtenus après tri des lymphocytes T du sang périphérique afin de discriminer, lors de l'analyse, les variants somatiques des polymorphismes constitutionnels.

Dans notre travail, ont été utilisées 2 librairies conçues par le Dr F Lepretre (Plateforme de Génomique du CHU de Lille). Une librairie est définie comme une collection de fragments d'ADN représentative des séquences cibles à étudier.

Le panel de la première librairie de gènes comprenait : *CXCR4*, *MYD88* (exon 5), *ARID1A*. Les résultats obtenus pour le séquençage du gène *ARID1A* ne seront pas présentés dans ce travail de thèse. En effet, un défaut de la couverture du gène *ARID1a* sur l'exon 1 a nécessité la mise au point de 6 PCR de séquençage en sanger. L'analyse des résultats est donc en cours.

Un total de 7 couples d'amorces permettait de couvrir la totalité du gène *CXCR4*. L'exon 5 de *MYD88* était séquençé par 2 amplicons (Figure 14).

Au cours de ce travail, nous avons séquençé en NGS certains gènes d'intérêt associés à des voies de signalisation connectée à l'axe CXCL12/CXCR4 :

- les gènes du BCR : *CD79B* (exons 5-6), *CD79A* (exons 4-5), *CARD11* (exon 5-9)
- les gènes de la voie RAS : *N RAS* (exons 5-6), *K RAS* (exons 4-5), *BRAF6* (exon 15), *PTEN* (exons 7 et 9).

Pour cela, nous avons utilisé un panel de NGS ciblé disponible au Centre de biologie pathologie du CHU de Lille (IAD44330_92_design) qui comprend 2 *pools* (*Pool 1* : 176 amplicons/*Pool 2* : 171 amplicons). Au total, 19 gènes sont analysés dans ce panel : *ATM*, *BIRC3*, *BRAF6*, *CARD11*, *CD79A*, *CD79B*, *DNMT3A*, *EZH2*, *FBXW7*, *KMT2D*, *KRAS*, *MYD88*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NRAS*, *PTEN*, *SF3B1*, *TNFAIP3*, *TP53*. Notre analyse s'est concentrée sur les résultats obtenus pour les gènes d'intérêt de notre travail au regard de leur lien fonctionnel avec *CXCR4*. Pour les autres gènes du panel, soit aucune mutation n'a été détectée (*DNMT3A* par exemple) soit les variants observés nécessitent la vérification de leur caractère délétère ou somatique.

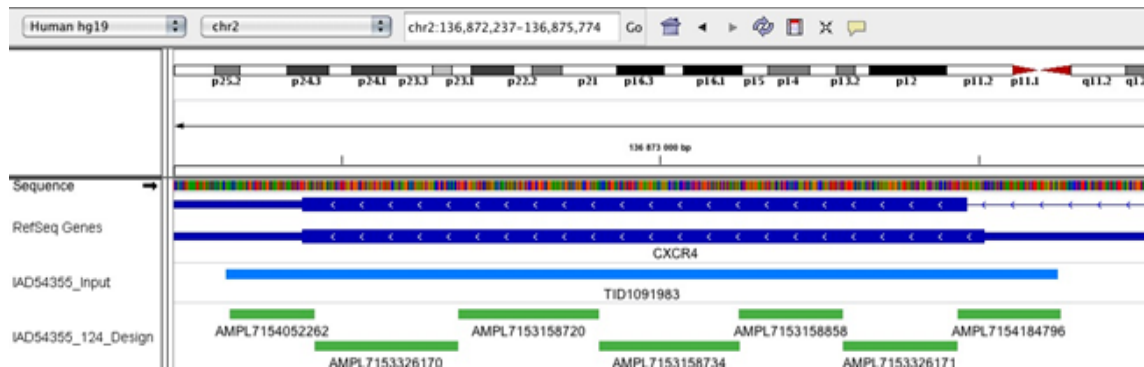
L'ensemble de ces gènes ont été étudiés par séquençage ciblé de type NGS Ampliseq® sur PGM™ selon les mêmes modalités analytique que pour le panel spécifique de recherche.

Le schéma analytique comprend 4 étapes :

- o Construction des librairies
- o Préparation de la matrice par PCR en émulsion et enrichissement
- o Séquençage de la matrice
- o Analyse des données de séquençage

Figure 14 : Représentation des amplicons conçus lors du design du panel de NGS comprenant le gène *CXCR4* et l'exon 5 du gène *MYD88*. En vert : les amplicons. En bleu clair : la séquence totale couverte par l'ensemble des amplicons utilisé. En bleu foncé : la séquence du gène de référence. Visualisation obtenue via IGV (*Broad Institute*).

CXCR4



MYD88



III.4.1 PREPARATION DES LIBRAIRIES

La librairie est préparée avec le kit Ion Ampliseq™ Library 2.0-384 LV (Life Technologies®).

A partir de 10 ng d'ADN génomique par patient, les PCR multiplex permettent l'amplification de la totalité des fragments génomiques d'intérêt. Après l'étape d'amplification, une digestion des amorces par le réactif FUPA est réalisée. L'étape suivante consiste à réaliser une ligation des adaptateurs P1 et A qui sont ajoutés aux deux extrémités de chaque fragment par une ADN ligase. Ils permettront la PCR en émulsion en créant des sites de fixation aux billes de capture ainsi que l'hybridation des amorces de séquençage. L'adaptateur A comprend également une séquence « code-barres » c'est-à-dire d'identification permettant le séquençage de plusieurs échantillons différents en parallèle sur un même support.

Une première étape de purification à l'aide de billes AMPure™ 1.5X (Beckman Coulter®) est initiée après la ligation ce qui permet la fixation des amplicons et leur lavage à l'éthanol. L'étape de *nick-translation* termine la liaison entre les adaptateurs et les fragments d'ADN. Une seconde étape de purification est alors réalisée permettant l'élimination de l'ADN génomique résiduel. Les billes AMPure 1.2X sont utilisées pour éliminer les amorces en excès. Après 2 lavages à l'éthanol, l'élution des amplicons est réalisé dans le tampon TE.

Chaque PCR multiplex est ensuite quantifiée sur TapeStation® (Agilent Technologies®). Une normalisation des solutions contenant les amplicons est réalisée puis les solutions contenant les amplicons sont réunies pour former la librairie finale qui est enfin quantifiée sur Bioanalyzer® (Agilent Technologies®) puis diluée.

III.4.2 PCR EN EMULSION ET ENRICHISSEMENT

Lors de deuxième étape, l'amplification de la librairie d'ADN par PCR en émulsion est réalisée à l'aide du kit Ion OneTouch™ 200 Template V2 (Life Technologies®). C'est à la surface de billes ou ISP (Ion Sphere™ Particles) contenues dans des microgouttelettes d'une émulsion eau/huile que la réaction de PCR s'effectue. Chaque microgouttelette ne contient qu'une bille et un seul fragment d'ADN dans les conditions optimales : cette approche permet ainsi une amplification « clonale ». Après l'étape de PCR, l'émulsion est finalement cassée. Après récupération des ISP portant de multiples copies d'un même fragment, un enrichissement est effectué.

L'enrichissement des ISP par billes magnétiques (MyOne™ Beads) est réalisé sur ES Ion OneTouch (Life Technologies®). Un contrôle sur Qubit 2.0 (Life Technologies®) est effectué. Une première sonde marquée à l'Alexa Fluor 488 s'hybride sur le primer B contenu à la surface de toutes les ISP et une seconde sonde marquée à l'Alexa Fluor 647 s'hybride sur la séquence adaptatrice A en bout de fragments d'ADN. L'analyse du ratio de fluorescence Alexa Fluor 647/488 permet ensuite le calcul du rendement de la réaction. Ce rendement doit être inférieur à 30 % pour la fraction non enrichie, et supérieur à 50 % pour la fraction enrichie.

III.4.3 ETAPE DE SEQUENÇAGE

La librairie ainsi confectionnée est ensuite déposée sur puce Ion 318™. L'étape de séquençage démarre alors sur Ion Personal Genome Machine (PGM™, Life Technologies®) à l'aide du kit Ion PGM™ 200 Sequencing.

La technologie du PGM™ dérive de celle du pyroséquençage. La synthèse d'ADN est initiée base par base par une ADN polymérase. La particularité du PGM™ est d'utiliser un système de détection électrochimique. La réaction s'effectue dans des micropuits munis de capteurs et organisés en réseau sur une puce semi-conductrice de type CMOS (*complementary metal-oxide-semiconductor*). Une modification de pH est induite par la libération d'un ion H⁺ lors de l'incorporation d'un nucléotide sur l'extrémité 3'OH du brin naissant par l'ADN polymérase ce qui permet la détection de la synthèse de l'ADN. Le principe de la réaction de séquençage repose alors sur une série de lavages avec quatre solutions de désoxyribonucléotides (A, C, G ou T). La diminution de pH observée est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés et est convertie en différence de potentiel. L'intensité du signal détecté est donc proportionnelle au nombre d'ions H⁺ libérés qui est lui-même égal au nombre de nucléotides incorporés lors de chaque lavage.

III.4.4 ANALYSE DES DONNEES

Pour l'analyse des fichiers générés par l'analyse sur PGM™, deux logiciels d'intérêts complémentaires sont utilisés :

- Torrent Browser™ (Life Technologies®)
- SeqNext™ (JSI® Medical Systems).

Les séquences ou *reads* sont tout d'abord alignées sur le génome de référence (Hg19). Les séquences considérées de mauvaise qualité sont exclues de l'analyse. Deux paramètres principaux sont analysés lors de l'interprétation des données :

- la couverture (région du génome séquencée par un nombre suffisant de *reads* qui correspond au nombre de lecture de chaque base)
- la profondeur suffisante (nombre de *reads* couvrant la région d'intérêt) sur la totalité de la région étudiée : une profondeur est jugée satisfaisante si au moins 100 *reads* sont analysables pour l'ensemble des amplicons.

Ces paramètres sont interprétés pour l'ensemble des échantillons identifiés par leurs codes-barres uniques.

L'analyse des données consiste ensuite à distinguer les mutations des artéfacts. En effet, des artéfacts (gains ou pertes de base) peuvent être ainsi observés dans les régions d'homopolymères comprenant des répétitions d'une même base : il s'agit d'un des inconvénients de la technique de séquençage en AmpSeq[®]/ PGM[™]. Comme la réaction ne s'arrête pas après chaque incorporation de nucléotide, la répétition d'un même nucléotide se traduira par un seul signal d'intensité plus élevée. Les séquences d'homopolymères plus longues constituent donc une difficulté pour le séquençage par cette technique. Plusieurs indicateurs permettent néanmoins de juger de la réalité d'un variant : profondeur de couverture, concordance entre le nombre de *reads* sens et antisens mutés, pourcentage de séquences mutées, récurrence du variant,...

Un variant est considéré si au moins 20 *reads* sont détectés avec un minimum de 100 *reads* analysables au total. Enfin, dans notre étude, toutes les mutations de *CXCR4* échantillons identifiées par NGS ont été vérifiées par méthode de séquençage de type Sanger.

Pour quantifier le clone muté, nous avons déterminé le VAF (variant allele frequency) calculé par le ratio du nombre de *reads* couvrant chaque position divisé par le nombre de *reads* total. Le VAF a été corrigé par le pourcentage de cellules tumorales déterminé dans le culot cellulaire trié par cytométrie de flux.

La séquence complète de la région codante et des sites d'épissage a été générée à une profondeur d'au moins 2000X par nucléotide : la sensibilité de détection des allèles mutés est donc d'environ 1%.

III.5 PCR DE SEQUENÇAGE DE TYPE SANGER

III.5.1 PRINCIPE

La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. La réaction de séquençage proprement dite consiste en une synthèse *in vitro* d'ADN avec une incorporation aléatoire de dideoxynucléotide (ddNTP). La première étape consiste à réaliser une amplification par PCR. Elle est ajoutée à un mélange réactionnel comprenant une ADN polymérase (Taq polymérase), une amorce s'hybridant en 5' du fragment à séquencer, un tampon et un mélange de dNTP+ddNTP. Chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome spécifique. L'incorporation d'un ddNTP stoppe la réaction d'élongation.

La synthèse d'ADN s'effectue de façon complémentaire à la matrice initiale. Ainsi, à chaque position de A sur le brin matrice, un dTTP ou un ddTTP fluorescent sera incorporé. Comme la

réaction de séquence est réalisée à partir d'un très grand nombre de copies de la matrice, l'incorporation aléatoire des ddNTP conduit à leur incorporation à toutes les positions possibles sur le segment d'ADN. Ces fragments néosynthétisés sont ensuite séparés après migration dans les capillaires du séquenceur automatiques. Un faisceau laser excite le fluorochrome des ddNTP. Après capture par une caméra, un électrophorégramme est obtenu grâce à analyse des données brutes (*raw data*) par un logiciel d'analyse SeqScape® (correction du bruit de fond, reconnaissance des bases, alignement de la séquence).

L'exone 2 qui code pour la partie C terminale de CXCR4 a été séquencée avec les amorces décrites par l'équipe de Lee (164). Les domaines ITAM des gènes *CD79B* et *CD79A* et l'exon 5 du gène *MYD88* sont séquencés avec les amorces présentées dans le Tableau 8 (248, 321). Tous les résultats de séquençage de l'exon 5 de MYD88 ont été vérifiés par une technique de PCR en temps réel (Kit qBiomarker®, Qiagen) (249).

Tableau 8 : Amorces utilisées pour le séquençage Sanger.

	Nom	Séquence oligonucléotidique
<i>CD79A</i>	Amorce Sens	5'-AGGGTGCTGATGTTCGCT-3'
	Amorce Antisens	5'-TAAGGAAGCCCCCAGAAG-3'
<i>CD79B1</i>	Amorce Sens	5'-GGGCTGGGGGACACTAACACTC-3'
	Amorce Antisens	5'- TGGGTGCTCACCTACAGACCAC- 3'
<i>CD79B2</i>	Amorce Sens	5'-CGGGGTCAGTGGCCACTATCTG- 3'
	Amorce Antisens	5'-AGCAGTCACTGAGGCCAGGGAG-3'
<i>CXCR4 Lee</i>	Amorce Sens	5' TGGAAATCATCAAGCAAG GG 3'
	Amorce Antisens	5' – TGTACAATATTGGTCAGTCTTTTATATCTG- 3'
<i>MYD88</i>	Amorce Sens	5'-GTTGAAGACTGGGCTTGTC-3'
	Amorce Antisens	5'-AGGAGGCAGGGCAGAAGTA-3'

III.5.2 PROTOCOLE ET ANALYSE DES DONNEES :

- Amplification par PCR

Cette technique permet d'amplifier un fragment d'ADN en utilisant une enzyme de polymérisation (Taq HotStar) en présence de dNTP (désoxyribonucléotide 5'-triphosphate), d'eau, de MgCl₂ et des amorces spécifiques.

Les produits de PCR générés sont contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose (2%) puis purifiés afin d'éliminer les excès d'amorces et dNTP. Les ampligènes purifiés sont remis en suspension dans du tampon AE avant de pouvoir initier l'étape de réaction de séquence.

- Réaction de séquence et analyse

La réaction de séquence utilise les mêmes amorces sens et anti sens que la PCR initiale.

Après une étape de purification au P10 pour éliminer de l'excès de bases fluorescentes, les produits sont analysés sur le séquenceur ABI Prism 3730xl (Applied Biosystems®). L'analyse de la séquence est réalisée grâce au logiciel SeqScape®. Les résultats sont représentés sous forme d'électrophorégramme et comparés à une séquence de référence pour identifier la modification du profil indiquant la présence d'une mutation soit à l'état homozygote ou hétérozygote.

III.6 ANALYSE PAR PUCES A SNP :

Les puces à SNP sont des techniques de haute résolution qui combinent la détection de variation de nombre de copie et l'allélotypage. Cette approche permet la mise en évidence de nouveaux mécanismes oncogéniques tels que les pertes d'hétérozygoties en l'absence de variation de nombre de copies, les disomies uniparentales acquises (UPD) (116, 224). Ces analyses ont été réalisées au sein de la Plateforme des Biopuces du Service commun de Génomique de l'Institut contre le Cancer de Lille (IRCL) -Université de Lille 2 - IMPRT IFR 114.

L'analyse des puces à SNP a été effectuée à partir d'ADN extraits de cellules B tumorales triées de prélèvement de MO et d'ADN non tumoral obtenus après tri des lymphocytes T du sang périphérique utilisés comme control intra-individuel non tumoral afin de discriminer lors de l'analyse des variations génomiques acquises des constitutionnelles. L'analyse génomique a été réalisée sur puces Affymetrix SNP6.0. Ces puces de haute résolution comprennent 1.8 millions de marqueurs génétiques (906 000 sondes SNP et plus de 946 000 sondes pour analyse de variation de nombre de copies) (Figure 15).

Brièvement, une solution ajustée à 50 ng/µl d'ADN double-brin est réalisée. Pour chaque réaction sont utilisés 250 ng d'ADN. Une première étape de digestion enzymatique (enzyme Nsp1) de l'ADN est réalisée suivie d'une étape de ligation des adaptateurs et d'une amplification par 4 PCR distinctes selon les recommandations du fabricant. Les amplicons issus d'un même échantillon sont rassemblés et purifiés par des billes magnétiques. Ces amplicons sont ensuite fragmentés (fragments de 25 à 125 bp), marqués grâce à une terminal-déoxynucléotidyl-transférase (TdT) et hybridés sur puce. La puce est alors scannée pour numériser les signaux obtenus et permettre l'analyse des données.

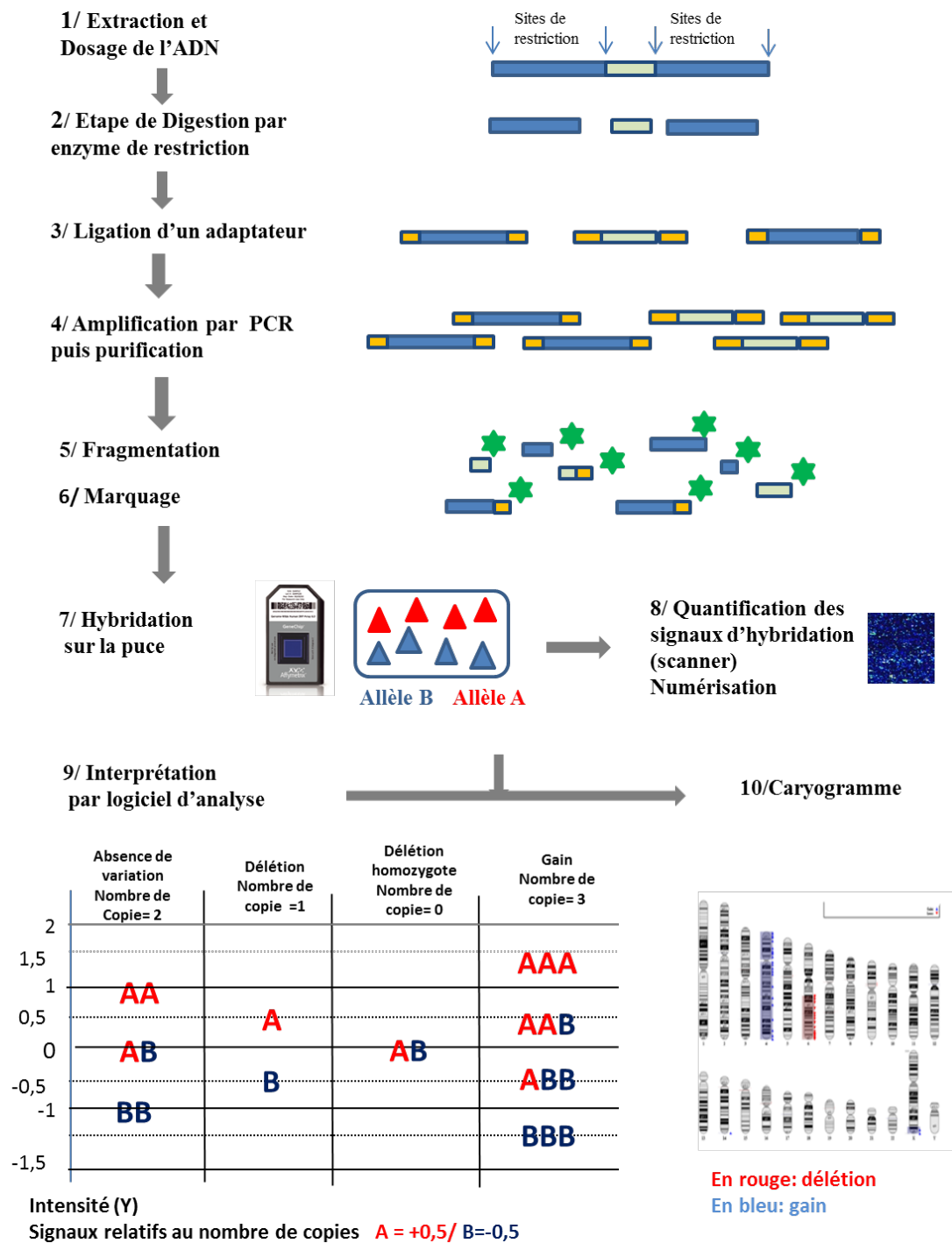
Différents résultats sont interprétés :

- o les CNV (Copy Number Variation)
- o les pertes d'hétérozygotie sans variation du nombre de CNV (UPD acquise).

Les tailles, les coordonnées des anomalies ainsi que les gènes inclus dans ces anomalies selon la référence de l'*UCSC Genome Browser* hg19 sont analysés. Les données générées par ces puces seront

interprétées en utilisant les logiciels suivants : *Chromosome Analysis Suite*TM (Affymetrix®) *Partek Genomics Suite*, *Partek GS for Copy Number Data*, *Partek GS for SNP Association Studies* (Partek Software). Une représentation sous forme de caryogramme peut être réalisée, un code couleur signalant les différentes anomalies mises en évidence.

Figure 15 : Protocole d'analyse par puces à SNP



III.7 ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE CXCR4 ET D'AUTRES MARQUEURS EN CYTOMETRIE EN FLUX (CMF)

Des différentes techniques d'immunomarquage direct ont été réalisées dans notre étude afin d'étudier en particulier le profil d'expression de CXCR4, des marqueurs plasmocytaires CD38 et CD138, du marqueur des lymphocytes mémoires CD27, du CD80 et du CD86.

La stratégie d'immunomarquage a utilisée 5 fluorochromes, la FITC (*fluorescein isothiocyanate*), la PE (*phycoerythrin*), l'ECD (*phycoerythrin-Texas red*), la Pc5 (*phycocyanin*) et la Pc7, couplés aux anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes membranaires analysés.

Ont été utilisés dans notre étude les anticorps monoclonaux suivant (Beckman Coulter) : CD19-ECD (clone J4.119), CD38-Pc5 (clone LS198.4.3), CD2-Pc7 (clone 39C1.5), CD27-Pc5 (clone 1A4CD27), CD49d-FITC (clone HP2/1), CD138-PE (clone B-A38), CD86-PE (HA5.2B7), CD80-FITC (MAB104), un mélange d'anticorps κ -FITC/ λ -PE/CD19-ECD (clone polyclonal/J3.119).

L'expression de CXCR4 a été analysée à l'aide de l'anticorps CXCR4-PE (clone 12G5) (R&D Biosciences). Les protocoles d'immunomarquage utilisés pour l'analyse multiparamétrique selon les combinaisons sont présentés dans le tableau 9. Les contrôles isotypiques correspondent à chaque clone utilisés dans le tube de marquage témoin.

Le score de Matutes a été établi selon le protocole du laboratoire d'hématologie de routine.

Les études en cytométrie de flux ont été réalisées à partir de CMN fraîches après isolement par technique Ficoll® ou après cryopréservation en azote liquide et décongélation (l'absence d'impact sur le niveau d'expression des différents marqueurs de la cryopréservation a été préalablement validée).

- Après numération des éléments, 250 000 cellules sont incubées avec les anticorps spécifiques ou les isotypes de contrôle pendant 15 minutes ou 1 heure à température ambiante ou à 4°C et à l'obscurité selon les combinaisons de marqueurs analysés.
- Au terme de l'étape d'immunomarquage, les globules rouges résiduels sont lysés à l'aide de solution de lyse *Optilyse*® (Beckman Coulter). Un lavage en tampon PBS est ensuite réalisé. Le culot cellulaire est remis en suspension pour analyse immédiate en cytométrie en flux. Le cytomètre utilisé dans notre étude est le *Cytomics FC 500*® (Beckman Coulter). L'acquisition des résultats est réalisée sur 10 000 à 50 000 événements.

Le logiciel informatique *Cytomics RXP Analysis*® Software (Beckman Coulter) a permis l'analyse des données. Le fenêtrage de la population d'intérêt (lymphocytes CD19⁺) est réalisé selon le niveau d'expression membranaire du CD19⁺ et des critères morphologiques de taille et de structure (FS/SS). Des histogrammes mono ou bi-paramétriques permettent de présenter la répartition des événements en fonction des différents paramètres analysés. L'intensité de la fluorescence émise est estimée proportionnelle à la densité de l'antigène exprimé par les cellules. Cette fluorescence est

toujours comparée à celle obtenue dans les mêmes conditions opératoires avec un anticorps de contrôle isotypique utilisé à une concentration identique.

L'intensité d'expression des différents marqueurs analysés dans notre étude est analysée sur la population CD19+ et est exprimée :

- en pourcentage de cellules positives : fraction des cellules dont la fluorescence est supérieure à celle du témoin isotypique

- en moyenne d'intensité de fluorescence relative (MIFR) : rapport entre la moyenne de fluorescence spécifique du marqueur et la moyenne de fluorescence de l'isotype de contrôle.

Tableau 9 : Combinaisons immunophénotypiques analysées.

Combinaison de marqueurs /Fluorochrome		κ/λ CD38CD2	κ/λ CD27	CD49d CD138CD38	CXCR4 CD38	CD80 CD86
FITC	Témoin	10 μ l IgG1	10 μ l IgG1	10 μ l IgG1	10 μ l IgG1	10 μ l IgG1
	Spécifique	10 μ l κ	10 μ l κ	10 μ l CD49d	10 μ l CD49d	10 μ l CD80
PE	Témoin	10 μ l IgG1	10 μ l IgG1	10 μ l IgG1	20 μ l IgG2a	10 μ l IgG2b
	Spécifique	10 μ l λ	10 μ l λ	10 μ l CD138	20 μ l CXCR4	10 μ l CD86
ECD	Spécifique	10 μ l CD19	10 μ l CD19	10 μ l CD19	10 μ l CD19	10 μ l CD19
Pc5	Témoin	10 μ l IgG1	10 μ l IgG1	10 μ l	10 μ l IgG1	
	Spécifique	10 μ l CD38	10 μ l CD27	10 μ l CD38	10 μ l CD38	10 μ l CD3
Pc7	Témoin	10 μ l IgG1	10 μ l IgG1	10 μ l IgG1		
	Spécifique	10 μ l CD2	10 μ l CD2	10 μ l CD2		

III.8 L'ANALYSE DU TRANSCRIPTOME

Les techniques d'analyse transcriptionnelle par puces *GenChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array* (Affymetrix) ont été réalisées par la plateforme de génomique fonctionnelle et structurale de l'IRCL. L'analyse bioinformatique a été menée par C. Herbaux (Projet d'analyse transcriptionnelle dans la MW coordonné par le Pr Xavier Leleu) et Guillemette Marot (Université de Lille, UDSL, EA2694 Biostatistics / Inria Lille Nord Europe, MODAL, Lille).

L'analyse a pu être réalisée pour 7 patients atteints de MW :

- 2 patients avec mutation de *CXCR4*
- 5 patients sans mutation de *CXCR4*.

III.8.1 PRINCIPES DE L'ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE

L'extraction des acides ribonucléiques (ARN) à partir de culots cellulaires de cellules B triées a été réalisée à l'aide du kit *TRIzol® RNA Isolation Reagents* (254). L'intégrité de ces ARN a été ensuite évaluée grâce au *2100 Bioanalyzer®* (Agilent) ; les ARN de mauvaise qualité (*RNA integrity number* (Rin) inférieur à 6) n'ont pas été inclus dans notre étude.

La rétrotranscription a été effectuée à partir de 100 ng d'ARN grâce au kit *GenChip® IVT Express Kit* (Affymetrix).

Une étape de purification et de fragmentation des ADNc (ADN complémentaires) obtenus est ensuite réalisée avant l'hybridation sur une puce *GenChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array* (Affymetrix). Après 16 heures d'hybridation, une quantification d'expression des gènes est réalisée par un scanner. L'intensité de fluorescence observée pour un spot est proportionnelle à la quantité d'ARNm correspondant et par conséquent au niveau d'expression du gène correspondant.

III.8.2 ANALYSE DES DONNEES

Une analyse biostatistique grâce au logiciel gratuit « R » a été réalisée pour comparer les profils d'expression génique selon le profil mutationnel de *CXCR4* dans la MW.

Cette analyse est conduite de la façon suivante (123, 142, 190) :

- Normalisation : Les données d'expression génique ont été normalisées avec l'algorithme "the Robust Multi-array Average (RMA)".
- Analyse différentielle : réalisée à l'aide du logiciel Bioconductor R package "*limma*", qui est particulièrement intéressant à utiliser pour les modélisations impliquant des petits effectifs de

réplicats. L'option *limma* a été utilisée pour la modélisation particulière du même nom, adaptée à l'estimation de la variabilité dans le cas de petits échantillons pour chaque série.

- Correction FDR (*False discovery rate*) : il s'agit de la correction statistique appliquée aux tests multiples.
- Analyse supervisée : elle permet d'évaluer la corrélation entre un profil d'expression donné et une puce. Deux profils sont définis préalablement grâce aux sondes identifiées par l'analyse différentielle, le statut mutationnel *CXCR4*. Les sondes avec une valeur de P ajustée inférieure à 0.05 sont considérées comme significatives.
- Analyse bioinformatique des réseaux fonctionnels par l'intermédiaire du logiciel d'analyse de voies de signalisation IPA[®] (*Ingenuity Systems*). Ce logiciel permet d'identifier les voies de signalisation dont font partie les gènes identifiés par l'analyse différentielle par une analyse intégrative des données publiées.
- Une analyse par GSEA (gene set enrichment analysis) a été réalisée à partir de différents panels de gènes disponibles dans la collection C2 du MSigDB (Broad institute (<http://www.broad.mit.edu/gsea/msigdb/> Cambridge, USA). Le *package_The PGSEA package* (Kim) a été utilisé pour calculer les z-scores pour tous les panels de gènes et les valeurs statistiques des p ajustées lors de multiples analyses

III.9 ANALYSE STATISTIQUE

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel SPSS 15.0 software.

Pour l'analyse des relations entre les différents paramètres cliniques et biologiques et les paramètres moléculaires en fonction des effectifs et du type de donnée à étudier ont été utilisés : un test non paramétrique (Mann-Whitney), un test du Chi2 ou Fisher exact et un test de corrélation de Spearman.

Une valeur de P inférieur à 0,05 est considéré comme significative.

Le calcul des fractions de survie a été réalisé par méthode de Kaplan-Meier et les courbes de survie ont été comparées par test log-rank.

IV. RESULTATS

IV.1 DE NOUVELLES MUTATIONS DE CXCR4 IDENTIFIEES DANS LA MW

Nous avons dans un premier temps utilisé la stratégie de NGS pour analyser la séquence exonique complète du gène *CXCR4* dans un groupe de 53 patients atteints de MW.

Aucun trou de couverture de la séquence de *CXCR4* n'a été observé, la profondeur moyenne par base est de 2000X (sensibilité de l'ordre de 1% d'allèle muté).

Nous avons identifié 14 mutations dans ce groupe de 53 patients (26.4%). Toutes les mutations observées sont localisées dans l'exon 2 qui code pour le domaine C terminal intracytoplasmique de la protéine *CXCR4* et ont été vérifiées par technique de séquençage Sanger.

Une cohorte complémentaire de 45 patients a été ensuite étudiée par séquençage Sanger qui cible l'exon 2 de *CXCR4*.

Au total, 24 des 98 patients MW (24.5%) analysés présentent une mutation de *CXCR4* (*CXCR4*^{Muté}). Ont été identifiées 17 mutations différentes, parmi lesquelles 12 sont décrites pour la première fois dans la MW (300). Le caractère somatique de toutes ces mutations a été confirmé par l'analyse des l'ADN extrait à partir des lymphocytes T non tumoraux (Figure 16).

Une seule mutation de *CXCR4* est observée par patient et toutes les mutations sont hétérozygotes.

Parmi les mutations de *CXCR4* observées, 11 parmi les 24 (45.8%) et 13 des 24 (54.2%) sont des mutations de type non sense (*CXCR4*^{NS}) et *frame shift* respectivement (*CXCR4*^{FS}).

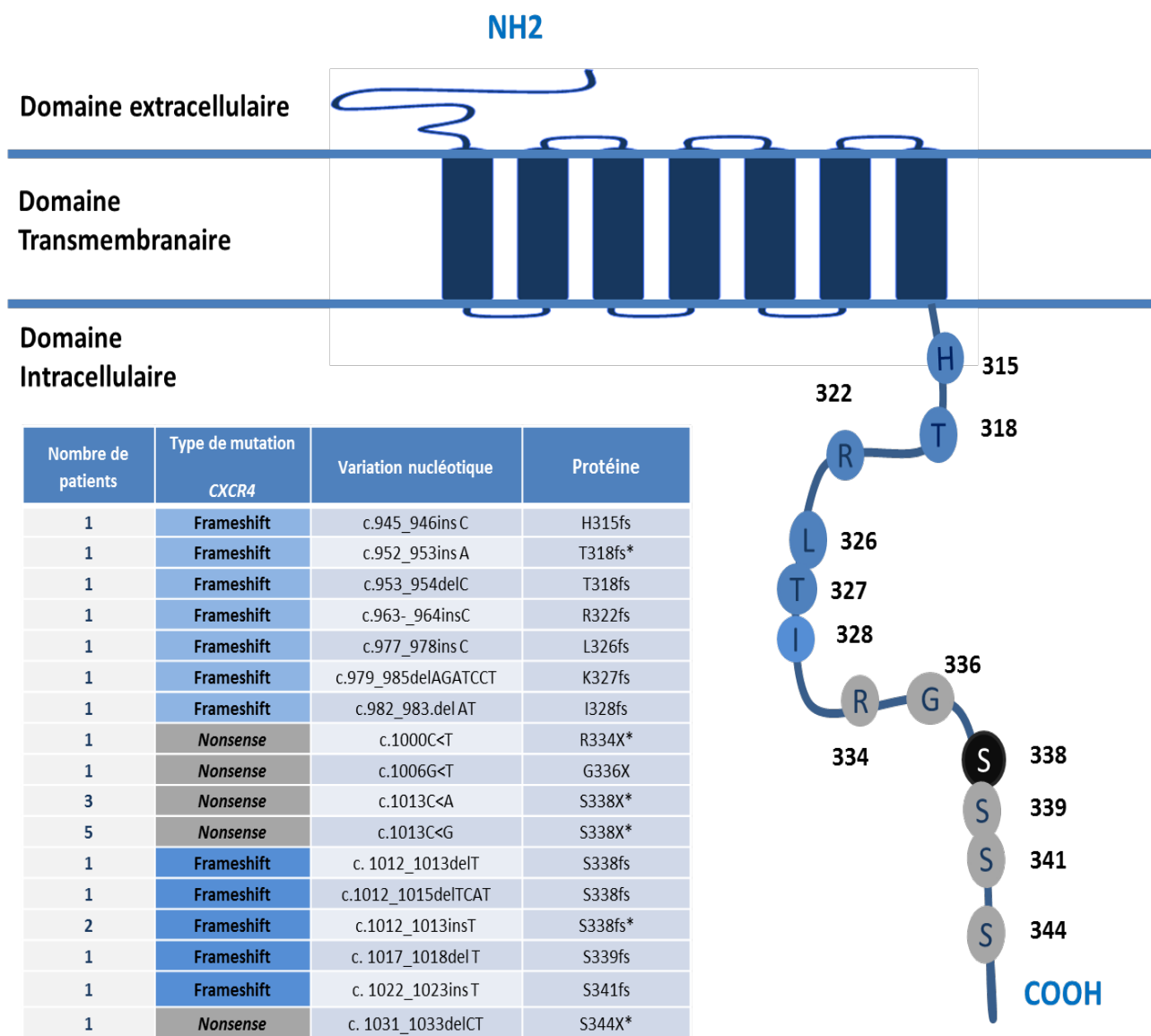
Toutes les mutations conduisent à une perte du domaine C terminal de *CXCR4*.

La mutation la plus fréquente est le variant *C1013G* (S338X) (5/98, 5.1%) suivi par le variant *C1013A* (S338X, 3 /98, 3%). Leur modélisation prédit un codon stop au niveau de la sérine en position 338. En effet, la sérine 338 est atteinte par une mutation dans 50% des cas dans notre cohorte suggérant l'existence d'un hotspot. D'autres variants identifiés dans notre cohorte ont été décrits dans le syndrome de WHIM telle que la mutation *CXCR4 R334X* (5, 27, 288).

Figure 16 : Représentation des mutations somatiques identifiées par séquençage sanger et NGS dans le domaine C terminal de *CXCR4* dans notre cohorte de patients atteints de MW.

Le tableau présente la liste des mutations identifiées et le nombre de patients pour chaque variant (n). Les mutations précédemment identifiées par le groupe de S. Treon sont marquées par * (300).

Sur cette représentation schématique, les sites des mutations sont notés en gris (mutation non sense) et en bleu (mutation *frameshift*). Le hotspot S338 est représenté en noir.



IV.2 ANALYSE DE LA CHARGE MUTATIONNELLE DE *CXCR4* ET *MYD88L265P* EN NGS

Les techniques de NGS permettent de quantifier la fraction de cellules présentant une mutation de *CXCR4* par l'analyse des VAF. Ce paramètre permet ainsi d'évaluer le pourcentage de mutation et donc de différencier une mutation clonale présente au niveau du clone dominant d'une mutation sous clonale présente dans une population minoritaire au sein du clone. Les mutations de *MYD88L265P* ont été analysées par NGS en parallèle.

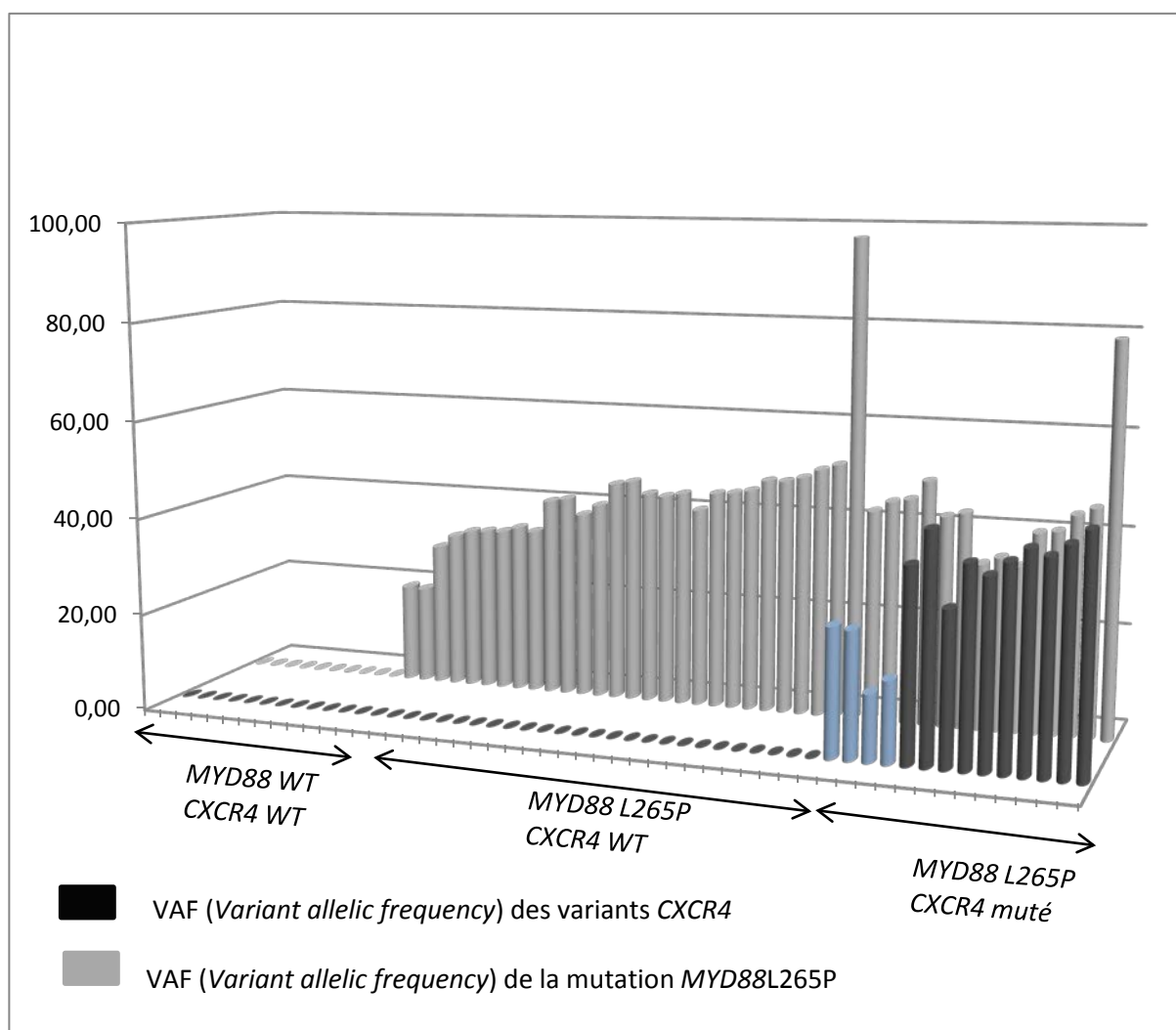
L'approche en NGS permet de bénéficier d'une sensibilité estimée à 1% au regard de la profondeur moyenne atteinte par base dans notre configuration de séquençage. Une cohorte de 53 patients a été ainsi étudiée (Figure 17).

Dans notre série, 81% (43/53) des patients présentent une mutation *MYD88L265P*. C'est la seule mutation observée au niveau de l'exon 5. Les VAF varient de 20,2% à 97,5% (moyenne : 44,13 %). Dans 2 cas, la fréquence allélique de *MYD88L265P* est supérieure à 50% : une UPD acquise en 3p22 au niveau du locus du gène *MYD88* est observée en puces à SNP.

La charge mutationnelle de *CXCR4*, quantifiée par l'analyse de la VAF, varie de 13,5 à 47,58% (moyenne : 35,93%). Notre série comprenait 14 échantillons de MW mutés *CXCR4*.

La mutation *CXCR4* peut être considérée comme sous clonale dans 4 cas (VAF variant de 13,5 à 26%).

Figure 17 : Représentation des VAF des mutations de *CXCR4* et de *MYD88* détectées par NGS dans la cohorte de MW. Chaque colonne représente un patient (axe des abscisses). Les VAF de la mutation *MYD88L265P* sont représentées en gris clair, les VAF des mutations de *CXCR4* en noir. Le pourcentage indique la fréquence allélique définie par le NGS et corrigée par le pourcentage de cellules tumorales dans l'échantillon trié pour chacun des 53 patients MW analysé chez chaque patient (Axe des ordonnées). Les mutations sous clonales de *CXCR4* sont signalées par une couleur bleue. WT : *Wild type* / absence de mutation



IV.3 SIGNATURE IMMUNOPHENOTYPIQUE ASSOCIEE AU GROUPE *CXCR4*^{MUTE}

IV.3.1 EXPRESSION DE *CXCR4*

Toutes les mutations de *CXCR4* observées dans notre étude sont localisées dans le domaine C terminal. Ce domaine joue un rôle critique dans le processus de désensibilisation qui contribue à la régulation de la transduction du signal et de l'expression de *CXCR4* (5). C'est pourquoi nous avons recherché l'impact des mutations de *CXCR4* sur le niveau d'expression de *CXCR4* en cytométrie de flux.

Un groupe de 53 patients comprenant 12 patients mutés *CXCR4* a été analysé (Tableau 10).

La protéine *CXCR4* est détectée dans tous les cas de MW de la cohorte. Toutefois, le niveau d'expression évaluée par la MFIR varie de 4.6 à 148.7 (moyenne : 37.47). Une expression plus élevée de *CXCR4* est observée dans le groupe des MW *CXCR4*^{Muté} ($p=0.003$, Figure 18 et 19). Cette augmentation d'expression est indépendante du type de mutation de *CXCR4*, frameshift ou non sens.

Aucune différence de niveau d'expression de *CXCR4* n'a été observée en fonction du statut mutationnel de *MYD88L265P*.

IV.3.2 EXPRESSION DU CD49D

Dans la maladie de Waldenström, *CXCR4* interagit directement avec le CD49d en réponse à une signalisation médiée par CXCL12/SDF1 au cours des processus de régulation de la migration et de l'adhésion cellulaire dans le microenvironnement médullaire (215).

Nous avons ensuite analysé l'impact de la mutation *CXCR4* sur le niveau d'expression de l'intégrine CD49d (VLA4) en cytométrie de flux dans la cohorte des 53 patients (Tableau 10).

Le CD49d est exprimé dans tous les cas de MW analysés dans notre série avec un seuil de positivité à 20% de cellules positives. Toutefois, des niveaux d'expression variable sont observés (MFIR moyenne : 11.43 (1.94-67.88)) (Figure 18).

Aucune différence de niveau d'expression du CD49d n'est observée selon le statut mutationnel de *CXCR4*. En revanche, une plus forte expression du CD49d est mise en évidence dans le groupe des patients avec mutation *MYD88L265P* ($p=0.048$) (Figure 19).

Figure 18 : Profil d'expression de CXCR4 et du CD49d en cytométrie de flux. Histogrammes monoparamétriques représentant l'expression de CXCR4 et du CD49d en cytométrie de flux. Différents profils génomiques sont présentés. L'isotype de contrôle est représenté en gris clair, le marquage spécifique en gris foncé. *CXCR4 WT* : absence de mutation *CXCR4* ; *CXCR4 muté* : Mutation *CXCR4S338X* ; *MYD88 WT* : Absence de mutation *MYD88L265P*

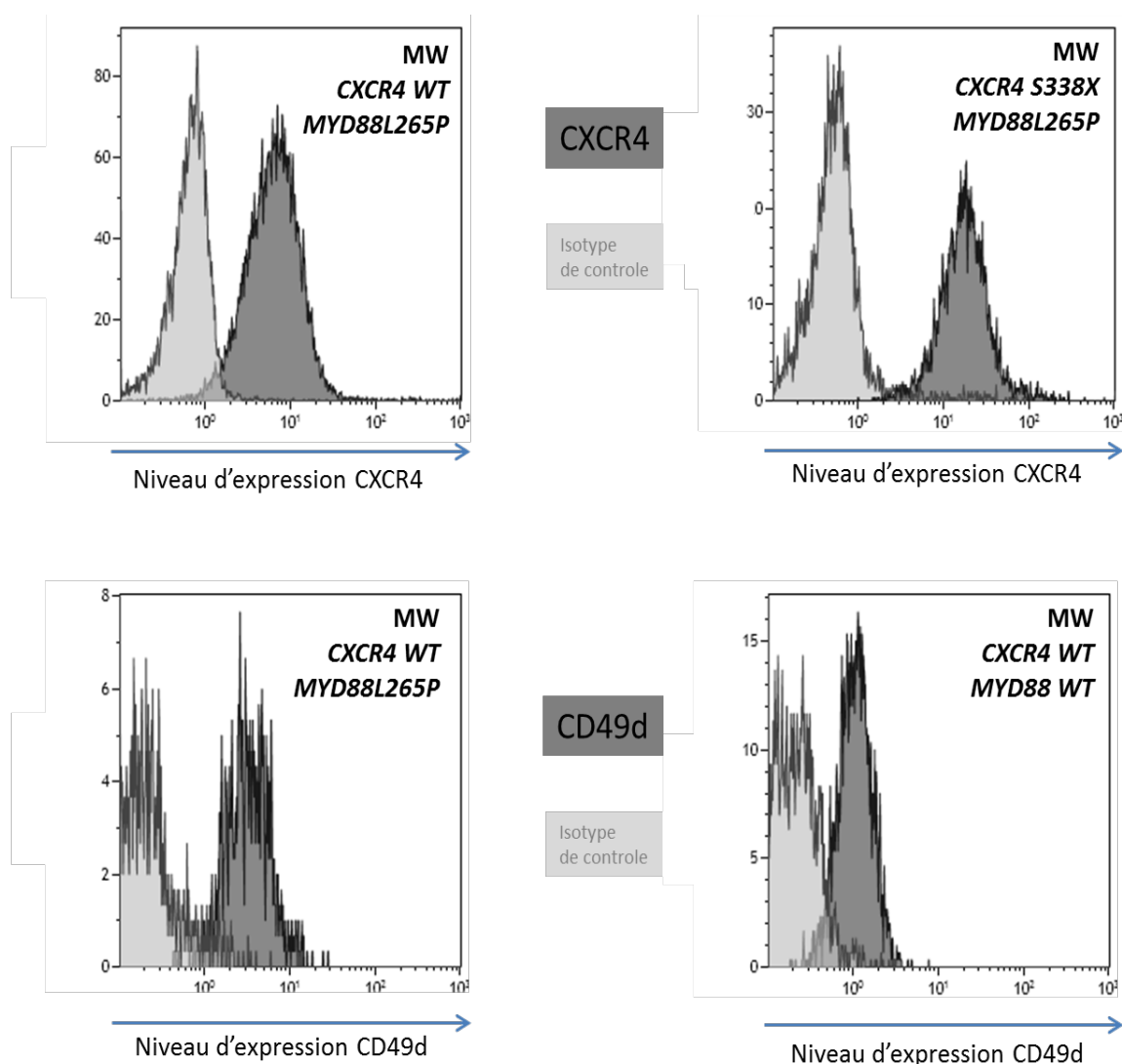


Figure 19 : Expression de CXCR4 et du CD49d selon le profil mutationnel de *CXCR4* (A et B) et de *MYD88* (C et D). Les boîtes à moustaches sont présentées montrant ainsi une superposition des points individuels.

Ns : Non significatif

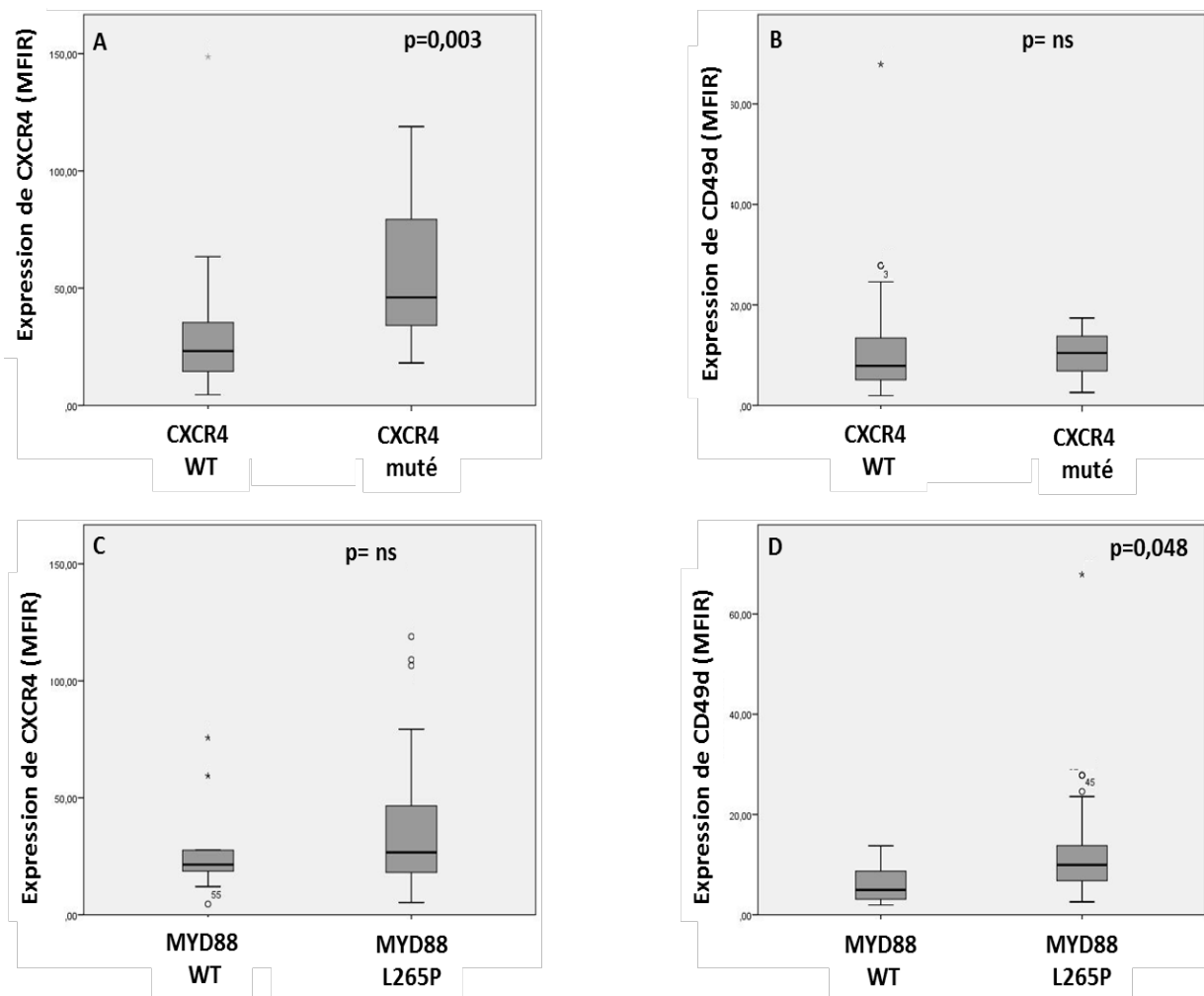


Tableau 10 : Profil d'expression observé en cytométrie de flux en fonction du statut mutationnel de *CXCR4*. NS : non significatif ; % : pourcentage

Marqueur	Total N=53	Mutation de CXCR4 N=12	Absence de mutation CXCR4 N=41	P
CXCR4 % de cellules positives	92 %	93% (71%-99.5%)	95 % (52%-99.4%)	NS
CXCR4 MFIR	37,47	59.99 (18.1-118.9)	28.71 (4.58-148.68)	P=0.003
CD49d % de cellules positives	85.8%	87.05% (73.7-99.5)	84.64% (49.1-99.8)	NS
CD49d MFIR	11.43	10.24 (2.57-17.38)	12.64 (1.94-67.88)	NS
CD38 % de cellules positives	53.4%	51.28% (10.2-97.2)	54.1% (2.9-99.7)	NS
CD38 MFIR	48.7	39.66 (10.2-125.41)	51.5 (1.07-252,45)	NS
CD138 % de cellules positives	19.8%	15.6 % (1.3-19)	21.2% (3.1-74.3)	NS
CD138 MFIR	10.88	5.21 (1.3-19.42)	12.81 (1.32-57.95)	P=0.034
CD80 % de cellules positives	28.4%	18.14% (6.2-42.5)	31.3% (4-100)	NS
CD80 MFIR	28.38	20.1 (1-43)	26.57 (1-100.36)	NS
CD86 % de cellules positives	14.4%	12.66% (2-24.1)	14.98% (0-89)	NS
CD27 % de cellules positives	33.17%	29.11% (4.3-87.3)	33.44% (5.5-81.5)	NS

IV.3.3 AUTRES MARQUEURS

Un lien fonctionnel associe le CD38, CXCR4 et le CD49d (45, 70). Le CD38 est considéré comme un marqueur de différenciation plasmocytaire comme le CD138 (syndécan) qui participe également aux processus d'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire (290).

Aucune différence de profil d'expression du CD38 n'a été observée selon le statut mutationnel de *CXCR4* dans notre série (Tableau 10). Le CD138 est exprimé dans 38.7% des cas évalués dans notre série (seuil de positivité >20 % de cellules positives). Un plus faible niveau d'expression du CD138 est observée dans le groupe des patients mutés *CXCR4* ($p= 0.034$).

Enfin, aucune différence significative n'a été mise en évidence en termes de niveau d'expression du CD27 (marqueur des lymphocytes mémoires), du CD80, du CD86 (médiateur de la synapse immunologique), du CD23, du CD10 et du profil K/L dans notre série.

Au total, le groupe des MW avec mutation de *CXCR4* présentent un niveau d'expression plus élevé de *CXCR4* et une plus faible expression du CD138.

IV.4 PAYSAGE MUTATIONNEL DES MUTATIONS *CXCR4*

La voie Ras peut être activée par *CXCR4* via les protéines G. PTEN, K Ras et N Ras sont des régulateurs cruciaux dans l'activation de la voie Ras (61, 69).

Les voies du BCR et du TLR sont également connectées au réseau activé par *CXCR4* (182).

Le voie du BCR peut être constitutionnellement activée soit par des signaux délivrés par le microenvironnement soit par des altérations génomiques (10, 73, 248). Des mutations activatrices du *CD79A* et *CD79B* et du gène *CARD11*, un régulateur de la voie NF κ B et partenaire du complexe CBM avec *BCL10* et *MALT1*, sont décrites dans les DLBCL ABC (34, 73, 175).

Pour caractériser une signature génomique associée au groupe *CXCR4*^{Muté}, un panel de gènes a été étudié en NGS dans notre cohorte (Figure 19) :

- la voie RAS (*PTEN*, *BRAF6*, *KRAS*, *NRAS*)
- la voie des TLR (*MYD88L265P*)
- la voie du BCR (*CD79A*, *CD79B*, *CARD11*).

Aucune mutation de la voie RAS n'a été identifiée dans notre série.

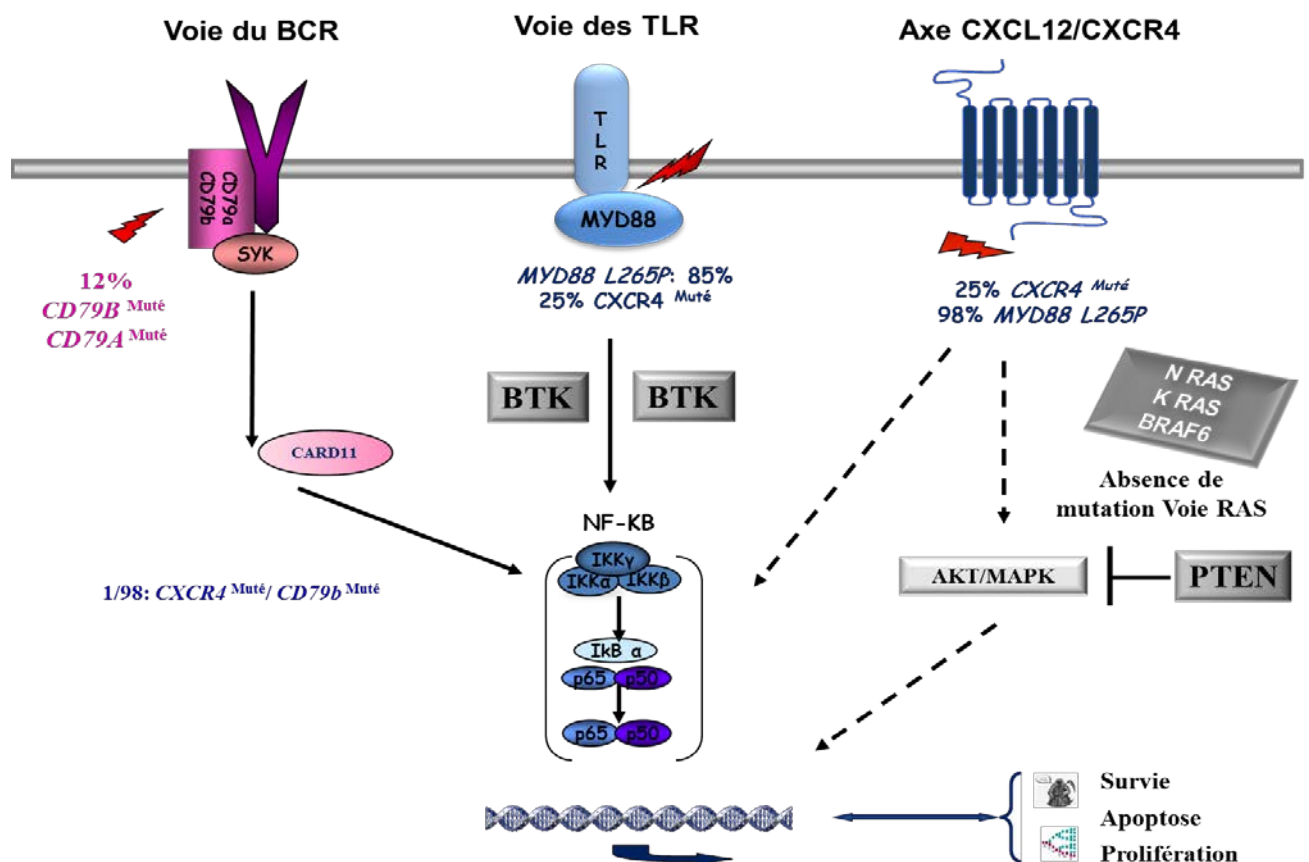
La fréquence de la mutation *MYD88L265P* est de 85.7% dans notre cohorte. Les MW *CXCR4*^{Muté} sont dans 98% des cas des MW avec mutation *MYD88L265P*. Un seul cas de MW avec une mutation *CXCR4*^{FS} est observé dans le groupe des MW non muté *MYD88L265P*. Cette forte corrélation entre les mutations *MYD88L265P* et *CXCR4* suggère leur coexistence au sein du même clone tumoral. Toutefois, dans 4 cas, une VAF plus faible est observée en comparaison de celle de *MYD88L265P* montrant l'existence de mutations sous clonales de *CXCR4* dans un sous-groupe de patients. L'analyse en séquençage de nouvelle génération en NGS suggérerait donc qu'il s'agirait d'un évènement secondaire dans la MW.

Aucune mutation de *CARD11* n'a été mise en évidence (n=98).

Les mutations du *CD79A* et du *CD79B* ont été observées dans 12.2% des cas de notre série (12/98) de MW :

- 9 mutations du *CD79B* : *Y196H*, *Y196S*, *Y196N*
- 3 mutations du *CD79A* : *Y199S*, *Del194-202*, *L199fsX4*

Figure 19 : Représentation du spectre mutationnel étudié dans la cohorte de MW.



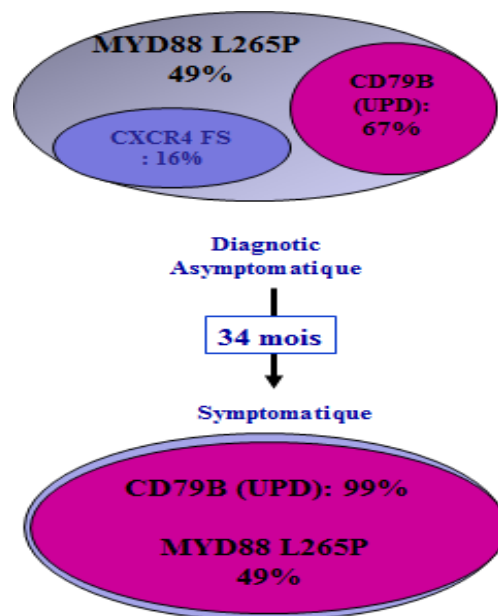
De façon intéressante, nous n'avons pas mis en évidence de coexistence de mutations *CXCR4* et du *CD79A/CD79B* à l'exception d'un seul cas qui présente un variant sous clonal de *CXCR4*.

Nous disposions d'un second prélèvement pour ce patient analysé 34 mois après son diagnostic lors de sa progression à la phase symptomatique : le profil mutationnel diagnostic/ suivi a donc été comparé (Figure 20).

Le clone *CXCR4* n'a plus été détecté en séquençage sanger et en NGS dans l'échantillon à la phase symptomatique. L'analyse comparée du type de mutations et de la fréquence allélique suggérerait que la mutation de *CXCR4* était présente dans un sous clone de la population mutée *MYD88L265P*, un autre sous clone étant porteur de la mutation du *CD79B*.

L'ensemble de ces données suggéreraient donc que les mutations des gènes du BCR (*CD79A/B*) seraient mutuellement exclusives de *CXCR4* au sein des MW *MYD88L265P*.

Figure 20 : Représentation des profils mutationnel *MYD88L265P*, *CXCR4* et *CD79B* chez un patient MW au diagnostic (phase asymptomatique) et lors de sa progression à une phase symptomatique. Une UPD en 17q au niveau du locus du gène *CD79B* est présente chez ce patient au diagnostic et lors de la progression, une augmentation de la charge mutationnelle de la mutation *CD79B Y196N* est alors observée. A ce stade, la mutation *CXCR4*, mise en évidence à la phase du diagnostic, n'est plus détectée. Les cercles colorés représentent les fractions mutationnelles par clone.



IV.5 ANOMALIES GENOMIQUES ASSOCIEES AUX MUTATIONS CXCR4

Nous avons recherché dans quelle mesure une signature en puces à SNP était associée au groupe *CXCR4*^{Muté} dans une série de 53 patients comprenant 12 cas avec mutation *CXCR4*.

La mutation *MYD88L265P* est présente dans 84.9% des cas. Une étude menée par notre groupe avait montré une différence de profil génomique dans le groupe des MW sans mutation *MYDL265P* qui se caractérise par une fréquence plus élevée de trisomie 3 (248). Aucune différence de fréquence de mutation *MYD88 L265P* n'est observée selon le statut mutationnel de *CXCR4* dans le groupe des MW étudié en puces à SNP. La série des 53 patients analysés est donc représentative de notre cohorte complète de 98 patients. Les mutations des gènes du *BCR* sont identifiées dans 8/53 cas étudiés. Il n'a pas été mené, au regard de ce faible effectif, d'analyse comparative du panorama génomique selon les mutations *CD79A/CD79B*.

D'autre part, le nombre de patients avec plus de 3 anomalies en puces à SNP a été décrit plus élevé dans le groupe des MW symptomatiques dans notre première série publiée de 31 patients (248). Nous confirmons, dans notre cohorte comportant désormais 53 patients, la fréquence plus importante de profil génomique complexe dans le groupe des patients symptomatiques ($p=0,0001$). En revanche, aucune différence significative de répartition du profil clinique symptomatique/ asymptomatique n'est observée dans les MW *CXCR4*^{Muté} (Tableau 11).

L'étude par puces à SNP n'a pas mis en évidence de variation de nombre de copies ou de disomie uniparentale acquise au niveau du locus de *CXCR4* (2q22).

Dans la série, les anomalies les plus fréquentes correspondent aux altérations classiquement associées aux MW :

- délétions 6q : 35.8%
- gain complet ou partiel du chromosome 4 : 22.6%

Nous avons ensuite analysé le profil génomique par puce à SNP en fonction du statut mutationnel de *CXCR4*. Nous avons, dans un premier temps, considéré la présence d'une anomalie génomique (délétion, gain ou CN LOH) identifiée par puce à SNP.

Dans le groupe des patients MW avec mutation de *CXCR4*, une fréquence plus importante d'anomalies est observée par rapport au groupe *CXCR4*^{WT} (91% versus 68%, $p=0.010$) (Tableau 11).

Dans un second temps, nous avons recherché la relation entre le nombre d'anomalies génomiques identifiées en puces à SNP considéré comme un reflet de la complexité et ou de l'instabilité génomique.

Un nombre d'anomalies plus élevée est mis en évidence dans le groupe *CXCR4*^{Muté} (5.8 versus 2.8 per patient, $p=0.046$). Aucune différence de profil génomique n'a été observée entre le groupe des mutations de *CXCR4* clonales ou sous clonales et selon le type de mutation de *CXCR4*.

Dans un troisième temps, la relation entre le type d'anomalies génomiques et le statut mutationnel de *CXCR4* a été étudié.

Nous avons observé dans le groupe des patients MW *CXCR4*^{Muté} une fréquence plus élevée de :

- trisomie 4 (complète ou partielle) ($p=0.002$)
- délétion 6q comprenant le gène *TNFAIP3*, un régulateur négatif de la voie NF κ B ($p=0.038$)
- gain du chromosome Xq, incluant *IRAK1*, un gène qui interagit avec la voie de signalisation MYD88 ($p=0.002$)
- délétion 8 p ($p=0.007$).

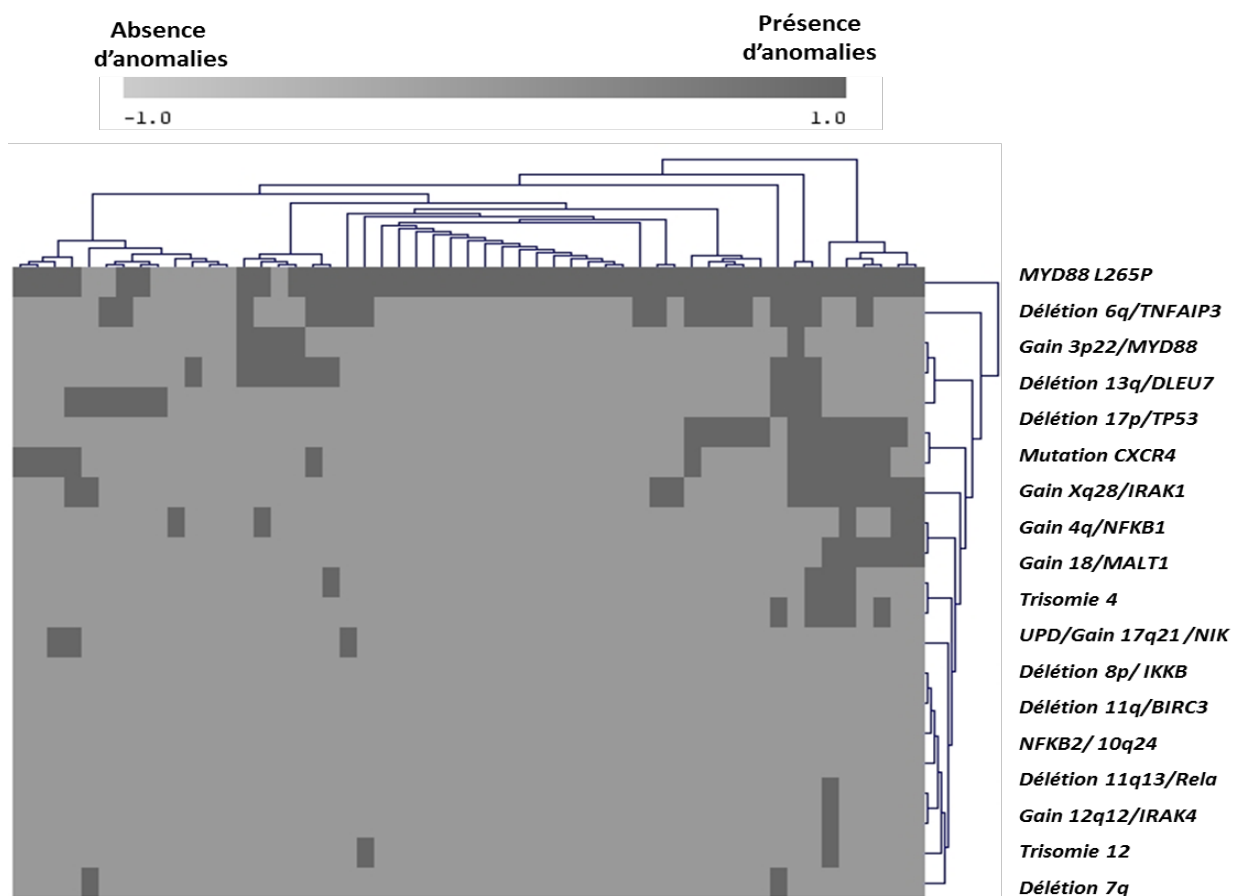
Aucune relation avec la présence de délétion 7q, 11q, 17p, 13q14 et la trisomie 18 n'a été mise en évidence.

Aucune différence de présentation génomique en puces à SNP n'a été observée selon le type de mutation de *CXCR4* (*CXCR4*^{Ns} versus *CXCR4*^{FS}).

Tableau 11 : Distribution des anomalies génomiques détectées par puces à SNP selon le statut mutationnel de *CXCR4*. NS : non significatif

Anomalies	Total N=53	Mutation CXCR4 N=12	Absence de mutation CXCR4 N=41	P
MYD88L265P	84.9%	12/12 (100%)	33/41 (80,4%)	NS
MW symptomatique	47%	7/12 (58.3%)	18/41 (43.9%)	NS
Présence d'au moins une anomalie	73.6%	11/12 (91.6%)	28/41(68%)	P=0.01
Complexe >3	37.7	7/12	13/41	P=0.09
Nombre d'anomalies	0-25 (Moyenne=3.41)	0-25 (Moyenne=5.8)	0-22 (Moyenne=2.8)	P=0.046
UPD	13.2%	2/12	5/41	NS
Délétion 6q	35.8%	7/12	12/41	P=0.038
Gain 4q	22.6%	7/12	5/41	P=0.002
Trisomie 4	11.32%	5/12	1/41	P=0.001
Gain Xq	22.6%	7/12	5/41	P=0.002
Deletion 8p	9.4%	4/12	1/41	P=0.007
Deletion 13q	18.86%	2/12	8/41	NS
Délétion 17p	16.98%	2/12	7/41	NS
Délétion 1p36	9.4%	3/12	2/41	P=0.07
Délétion 11q	5.6%	0/12	3/41	NS
Gain 3	9.4%	1/12	4/41	NS
Trisomie 18	9.4%	2/12	3/41	NS
Trisomie 18 +4	3.7%	1/12	1/41	NS
Trisomie 12	3.7%	1/12	1/12	NS
Deletion 7q	3.7%	0/12	2/41	NS

Figure 21 : Association des réseaux des altérations génomiques dans la MW. La figure représente le profil d'anomalies génomiques observées par puce à SNP, en cytogénétique conventionnelle et moléculaire (FISH) en fonction du statut mutationnel de *CXCR4* dans une série de 53 patients. Cette représentation des anomalies a été réalisée grâce au logiciel MeV software (TM4 microarray software suite) (265, 266). Chaque rang correspond à un locus d'intérêt ou à un gène cible de la voie canonique ou non canonique de la voie de signalisation NFκB présentant une anomalie génomique (gain ou délétion, disomie parentale acquise ou perte d'hétérozygotie en l'absence de variation du nombre de copie ou mutation). Chaque patient est représenté par une colonne virtuelle où les anomalies observées sont signalées selon un code couleur : noir = mutation, CN LOH, délétion ou gain du locus ou gène ; gris clair : absence d'anomalie.



IV.6 ANALYSE DU PROFIL TRANSCRIPTOMIQUE SELON LE STATUT MUTATIONNEL DE CXCR4

Nous avons étudié la signature transcriptionnelle par GEP (*gene expression profiling*) de 7 patients atteints de MW pour évaluer si la présence d'une mutation de *CXCR4*S338X (n=2) est associée à une signature transcriptomique.

L'analyse différentielle a permis d'identifier une signature associée au profil *CXCR4*^{Muté} comprenant 32 sondes couvrant 27 gènes (Figure 22).

Différents gènes comme *MMP8*, *CRISP3* ou *BRCC3* impliqués dans les processus de l'apoptose, de la survie et de la migration cellulaire (*ARG1*, *LYST*) sont différentiellement exprimés dans les 2 groupes. Ces gènes sont sous exprimés dans le groupe des 5 patients *CXCR4*^{WT} en comparaison du groupe des 2 patients *CXCR4*^{Muté} (Tableau 12).

Nous avons ensuite recherché les principales voies de signalisation dérégulées grâce au logiciel d'analyse Ingenuity®. La signature du groupe *CXCR4*^{Muté} est associée à certains réseaux fonctionnels comme le cycle cellulaire, la prolifération, les mécanismes de réplication de l'ADN ou d'interaction cellulaire.

Une approche en GSEA (*gene set expression analysis*) ciblant des panels de gènes précédemment associés aux mutations de *CXCR4* (260) a été réalisée dans notre série. La liste des 25 panels analysés est présentée dans le tableau 13.

Nous avons identifié une dérégulation de la voie du protéasome et du BCR/ lymphocytes B dans le groupe des MW *CXCR4*^{Muté} (p=0.01 and p=0.04, respectivement) (Tableau 13).

Figure 22 : Analyse du transcriptome. La heatmap représentant les valeurs d'expression normalisées pour les différentes sondes. La couleur varie selon la valeur de l'expression normalisée. L'échelle des données est mentionnée.

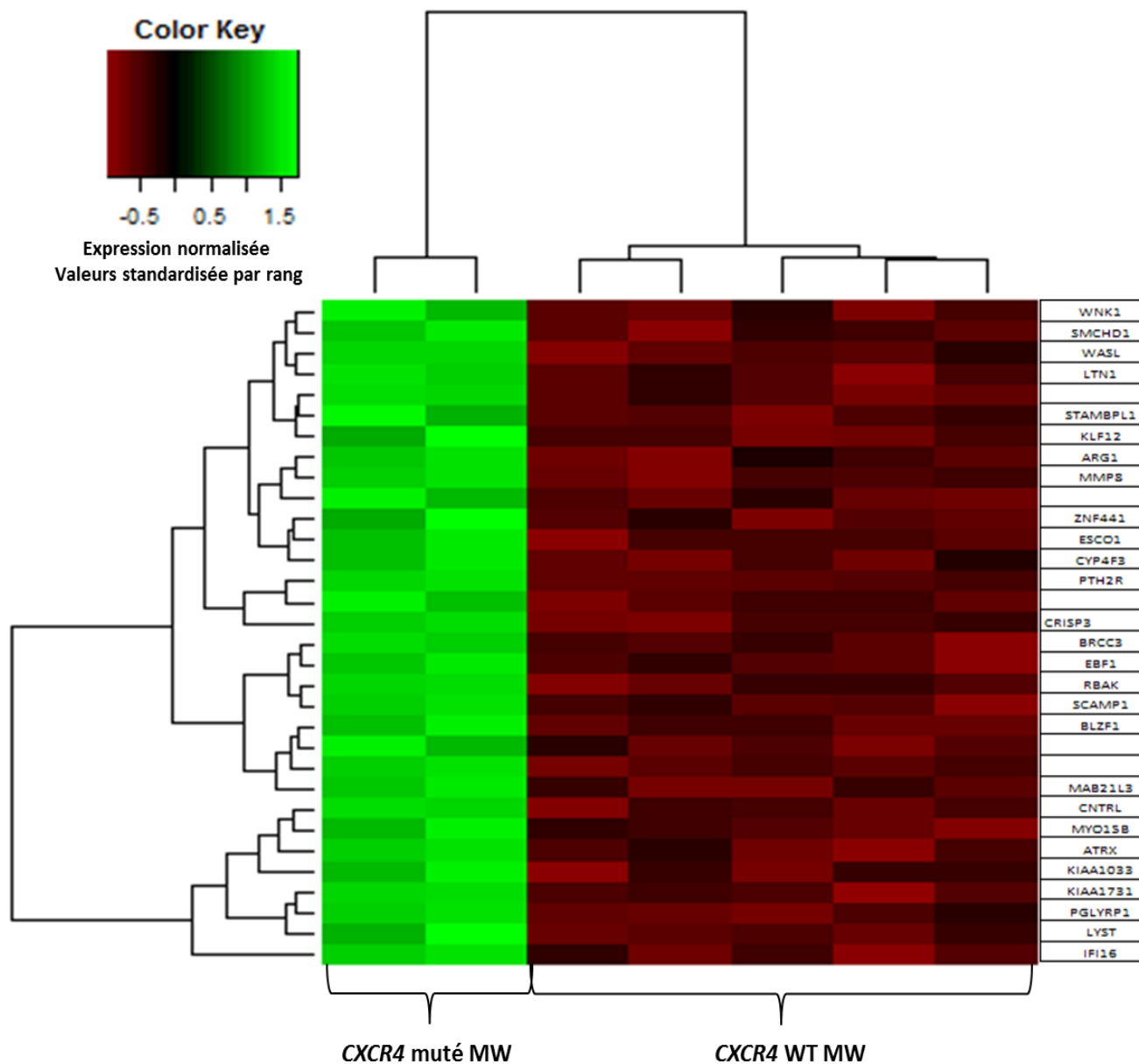


Tableau 12 : Liste des gènes dérégulés identifiés par l'analyse transcriptionnelle par puces U133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix, USA). Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significative.

Identité de la sonde	Symbole	Nom du gène	Localisation cellulaire	Type de protéine (s)	p value
206177_s_at	ARG1	<i>arginase 1</i>	Cytoplasme	Enzyme	0.03817
208859_s_at	ATRX	<i>alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>	Noyau	Régulateur de transcription	0.04590
1558560_s_at	BLZF1	<i>basic leucine zipper nuclear factor 1</i>	Cytoplasme	Régulateur de transcription	0.03412
216521_s_at	BRCC3	<i>BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3</i>	Noyau	Enzyme	0.03412
242916_at	CNTRL	<i>centriolin</i>	Noyau	Régulateur de transcription	0.03412
207802_at	CRISP3	<i>cysteine-rich secretory protein 3</i>	Espace extracellulaire	Autre	0.03412
206515_at	CYP4F3	<i>cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 3</i>	Cytoplasme	Enzyme	0.03661
233261_at	EBF1	<i>early B-cell factor 1</i>	Noyau	Régulateur de transcription	0.03817
235216_at	ESCO1	<i>establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1</i>	Noyau	Autre	0.03412
208965_s_at	IFI16	<i>interferon, gamma-inducible protein 16</i>	Noyau	Régulateur de transcription	0.03412
212794_s_at	KIAA1033	<i>KIAA1033</i>	Cytoplasme	Autre	0.03412
1569302_at	KIAA1731	<i>KIAA1731</i>	Cytoplasme	Autre	0.03817
206965_at	KLF12	<i>Kruppel-like factor 12</i>	Noyau	Régulateur de transcription	0.04590
233819_s_at	LTN1	<i>listerin E3 ubiquitin protein ligase 1</i>	Noyau	Enzyme	0.03412
210943_s_at	LYST	<i>lysosomal trafficking regulator</i>	Cytoplasme	Transporteur	0.03412
1553333_at	MAB21L3	<i>mab-21-like 3 (C. elegans)</i>	Autre	Autre	0.03412
207329_at	MMP8	<i>matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)</i>	Espace extracellulaire	Peptidase	0.03412
219173_at	MYO15B	<i>myosin XVB pseudogene</i>	Autre	Autre	0.03817
205041_s_at	ORM1	<i>orosomucoid 1</i>	Espace extracellulaire	Autre	0.03412
207384_at	PGLYRP1	<i>peptidoglycan recognition protein 1</i>	Membrane	Récepteur transmembranaire	0.04590
206772_at	PTH2R	<i>parathyroid hormone 2 receptor</i>	Membrane	Récepteur couplé aux protéines G	0.00182
1553122_s_at	RBAK	<i>RB-associated KRAB zinc finger</i>	Noyau	Régulateur de transcription	0.04528
212417_at	SCAMP1	<i>secretory carrier membrane protein 1</i>	Cytoplasme	Transporteur	0.04528
241620_at	SMCHD1	<i>structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1</i>	Noyau	Autre	0.03817
231891_at	STAMBPL1	<i>STAM binding protein-like 1</i>	Autre	Autre	0.04528
205809_s_at	WASL	<i>Wiskott-Aldrich syndrome-like</i>	Cytoplasme	Autre	0.03412
211993_at	WNK1	<i>WNK lysine deficient protein kinase 1</i>	Cytoplasme	Kinase	0.04835
1553192_at	ZNF441	<i>zinc finger protein 441</i>	Noyau	Autre	0.04528

Tableau 13 : Liste des réseaux fonctionnels analysés par GSEA.
Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significative.

<i>Pathways / Réseau fonctionnel</i>	p
UP_IN_C1013G_CXCR4_VS_UNMUTATED_Roccaro et al Blood 2014;123:4120-4131	0,11
BIOCARTA_DEATH_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,41
BIOCARTA_PROTEASOME_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,01
BIOCARTA_BCR_B LYMPHOCYTES_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,04
BIOCARTA_ERK-PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,39
BIOCARTA_AKT-ERK_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,2
BIOCARTA_DEATH_NFKB_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,56
BIOCARTA_DEATH_CELL CYCLE_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,36
BIOCARTA_CXCR4_CYTOKINE_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,18
WANG_tumor_invasiveness_down	0,3
WANG_tumor_invasiveness_up	0,52
RIZKI_tumor_invasiveness_3d_down	0,09
RIZKI_tumor_invasiveness_3d_UP	0,24
ANTIAPOPTOSIS_Affymetrix	0,87
cellprolifgo82831_Affymetrix	0,42
DNAdamage_Affymetrix	0,65
keshavamdr_Affymetrix	0,45
BIOCARTA_AKT_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.36
R4_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.82
BIOCARTA_CELLCYCLE_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.73
BIOCARTA_CYTOKINE_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.09
BIOCARTA_ERK_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.39
BIOCARTA_DEATH_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.42
BIOCARTA_MTOR_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.96
BIOCARTA_NFKB_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.43

IV.7 ETUDE DE LA VALEUR PRONOSTIQUE CLINIQUE DES MUTATIONS DE CXCR4

IV.7.1 PROFIL CLINICO BIOLOGIQUE DES PATIENTS MW AVEC MUTATION CXCR4

Nous avons cherché à identifier les caractéristiques clinico-biologiques associées à la présence de la mutation *CXCR4* (Tableau 14).

L'âge médian au diagnostic est de 67 ans dans notre cohorte (36- 92 ans).

Nous avons mis en évidence que la présence de la mutation de *CXCR4* est associée à un composant monoclonal plus élevé ($r=.309$; $p=.006$) et à la présence d'une thrombopénie ($r=-.226$; $p=.048$).

Dans la cohorte, 35% et 12% des patients présentent un pic monoclonal IgM supérieur à 30g/L ($p=0.023$), et 27% et 6.5% des patients une thrombopénie inférieure à 100 G/L ($p=0.018$), respectivement dans le groupe des patients *CXCR*^{Muté} versus *CXCR4*^{WT}.

Les patients mutés *CXCR4* sont plus fréquemment stratifiés dans le groupe 3 selon l'IPSSWM ($p=0.086$).

Aucune association n'a été retrouvée pour les autres paramètres biocliniques analysés (âge au diagnostic, taux d'hémoglobine,...) et en particulier la présence d'un syndrome tumoral comme une adénopathie ou une splénomégalie et la présence d'une localisation extramédullaire ou une lymphocytose, chacun de ces paramètres pouvant être considérés comme un marqueur de la dissémination de cellules tumorales de la moelle osseuse.

Tableau 14 : Caractéristiques des patients atteints de maladie de Waldenström selon le profil mutationnel de *CXCR4*

M/F: homme/femme

IPSSWM: International Prognostic Staging System for Waldenström Macroglobulinemia

NS : non significatif, se : erreur standard,

WT : Absence de mutation de *CXCR4*, *CXCR4*^{Muté} : mutation de *CXCR4*

	<i>CXCR4</i> ^{WT}	<i>CXCR4</i> ^{Muté}	
	(n=74)	(n=24)	p
Sex ratio (M/F)	1.2	1.1	
Age au diagnostic, médiane, ans	68	66	NS
IPSSWM stage 3, (%)	26	37	NS
Anémie, médiane (se), g/dL	11.5 (0.2)	11.4 (0.4)	NS
Hémoglobine < 10 g/dL, %	27	32	NS
Thrombopenie, médiane (se), x10 ⁹ /L	275 (14)	203 (25)	0.021
Numération plaquettaire < 100 x10 ⁹ /L, %	6.5	27	0.019
B2 –microglobuline, médiane, mg/L	3.3	3.6	NS
B2 –microglobuline > 3 mg/L, %	44	46	NS
Composant monoclonal IgM, médiane (se), g/L	18 (0.4)	29 (4.4)	0.028
IgM >30 g/L, %	12	35	0.023
Lymphocytose, médiane (se), x10 ⁹ /L	3.5 (0.8)	3.5 (1.3)	NS
Adénopathie, %	20	15	NS
Splénomégalie, %	13	18	NS
Cryoglobulinémie, %	18	10	NS
Agglutinines froides, %	15	10	NS
Anémie hémolytique autoimmune, %	5	5	NS
Hyperviscosité, %	4.5	12	NS

IV.7.2 ETUDE DE LA VALEUR PRONOSTIQUE CLINIQUE DES MUTATIONS DE CXCR4

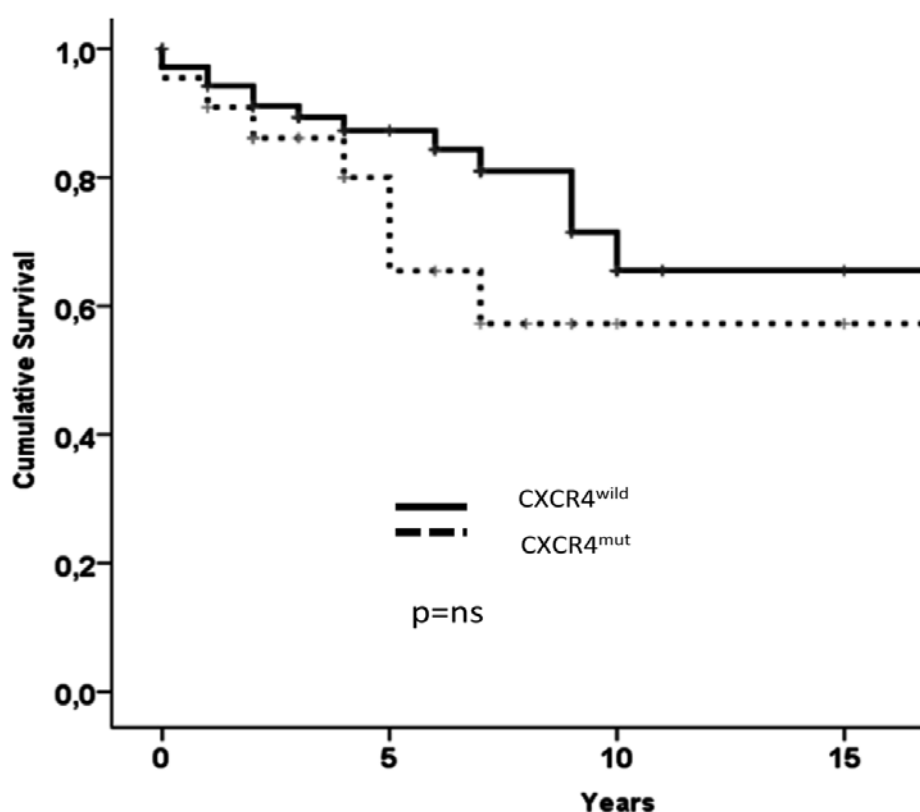
Avec une durée de suivi médian de 6 ans, 21 décès (22%) ont été enregistrés avec une survie globale médiane (IC95%) non atteinte, et estimée à 63% à 10 ans.

Aucune différence en termes de nombre et de type de lignes de traitement n'a été observée entre les groupes $CXCR4^{wild}$ et $CXCR4^{Muté}$ (données non présentées). Aucune transformation en lymphome agressif n'a été rapportée au cours de l'évolution des patients.

La survie globale estimée dans le groupe $CXCR4^{Muté}$ est de 50%, 65% dans le groupe des patients $CXCR4^{wild}$ ($p=ns$) (Figure 23).

De façon intéressante, une différence de survie significative est observée entre le groupe $CXCR4^{Muté}$ et le groupe $CXCR4^{wild}$ dans la sous population des MW asymptomatiques (Survie globale à 5 ans estimée à 50% versus 93% respectivement, $p=0.019$). Le délai de mise en route de traitement est plus court dans le groupe des patients $CXCR4^{Muté}$ que le groupe des $CXCR4^{wild}$.

Figure 23 : Représentation de la courbe de survie globale selon le statut mutationnel de $CXCR4$. La ligne pleine indique le groupe $CXCR4^{wild}$, la ligne en pointillé le groupe des patients atteints de MW avec mutation de $CXCR4$ ($CXCR4^{Mut}$). ns : non significatif.



V. DISCUSSION

L'objectif de notre travail était de décrire le paysage génomique et mutationnel des MW qui présentent une mutation *CXCR4*. Dans notre cohorte de 98 patients, nous avons mis en évidence une mutation de *CXCR4* dans 25% des MW, principalement dans le groupe des patients mutés *MYD88L265P*. Les mutations de *CXCR4* sont mutuellement exclusives des mutations des gènes du BCR (*CD79A/CD79B*). D'autre part, l'analyse du profil génomique en puces à SNP a montré l'existence d'une association entre la complexité génomique et la présence de mutation de *CXCR4*.

Les études du séquençage complet du génome ont identifié la présence de mutation dans le domaine C terminal chez 27% des patients analysés dans l'étude *princeps* menée par l'équipe de S. Treon (131). Les auteurs ont ensuite ciblé cette région pour étudier la fréquence de la mutation *CXCR4* dans la MW par technique de séquençage Sanger à partir d'ADN extrait à partir de cellules triées CD19+ dans une cohorte de 175 MW. Nous avons donc choisi, dans un premier temps, d'analyser tout le gène *CXCR4* en séquençage ciblé à haut débit afin de rechercher l'existence d'éventuelles mutations de *CXCR4* au niveau d'autres domaines fonctionnels de la protéine. Nos résultats, dans une cohorte de 53 patients, confirment la présence des mutations localisées uniquement dans l'exon 2 codant pour le domaine C terminal de la protéine *CXCR4*. Aucun variant dans le domaine extracellulaire n'a été observée. Les mutations observées sont donc comparables à celle initialement décrites dans le syndrome de WHIM (5, 119).

Nous avons identifié une mutation de *CXCR4* dans 25% de MW. La fréquence des mutations de *CXCR4* varient de 27 à 36% dans les 2 cohortes de MW actuellement publiées (275, 300). Tous les variants somatiques sont hétérozygotes et acquis car ils n'ont pas été identifiés dans la fraction non tumorale disponible pour chaque patient. Parmi les 17 mutations différentes mises en évidence dans notre travail, 12 n'avaient jamais été décrites dans la MW. Toutefois, les mutations affectent le plus souvent la sérine en 338. Les mutations la plus fréquentes sont la *CXCR4C1013G* et la *CXCR4C1013A* conduisant, dans les deux cas, à un codon stop en position 338 (*CXCR4S338X*). Une fréquence de 30% du variant *CXCR4C1013G* a été observée dans une série de 131 patients (260). Deux études publiées durant la révision de notre étude ont rapporté, dans des cohortes de 51 et 13 lymphomes lymphoplasmocytaires/MW, de nouvelles mutations de *CXCR4*, confirmant ainsi la diversité des types de mutations observables dans la MW (24, 275). Il est décrit, dans la MW, à la fois des mutations non-sens et *frame shift* du gène *CXCR4* (300). Les mutations de type *frame shift* sont en revanche rares dans le syndrome de WHIM alors qu'elles représentent environ la moitié des cas observés dans la MW (108, 119, 177, 298). Récemment, une mutation initialement décrite chez un patient atteint d'une WM a été identifiée dans un syndrome de WHIM (178).

Certaines de ces mutations non-sens de *CXCR4* ont été précédemment caractérisées sur le plan fonctionnel dans le syndrome de WHIM comme les variants *CXCR4R334X* ou *CXCR4S338X* (5, 119, 177, 288). La région C terminale intracellulaire joue un rôle crucial dans les processus de désensibilisation du récepteur CXCR4 : l'état de phosphorylation de ce domaine intracellulaire de CXCR4 par les GRK régule le cycle du récepteur CXCR4 (21, 48). C'est la perte d'un domaine essentiel à la fonction de CXCR4 qui constitue le point commun de l'ensemble de ces mutations somatiques ou germinales. Un défaut d'internalisation du récepteur est observé conduisant à une activation prolongée de CXCR4 (production augmentée de inositol phosphate, flux calcique, activation prolongée des voies de signalisation intracellulaire...) (5, 167). La variation de la charge nette de ce domaine C terminal modifie l'activité du récepteur (177). Notre groupe n'envisage pas de poursuivre l'étude de la caractérisation des mutations de *CXCR4* sur un plan fonctionnel avec une stratégie *CRISP/Cas9* par exemple, au regard des travaux en cours ou déjà publiés par le groupe de S. Treon. Dans la MW, la caractérisation fonctionnelle de la mutation *S338X* a été réalisée (49, 260). La mutation *CXCR4 S338X* est de type gain de fonction. Le défaut d'internalisation de CXCR4 après sa liaison avec CXCL12 entraîne une réponse anormalement prolongée des voies de signalisation en aval. Une activation constitutive des voies AKT et ERK est observée. L'étude préliminaire pour certaines mutations *frameshift* a montré le même type de profil fonctionnel (49). D'autre part, les variants somatiques de *CXCR4* sont peu fréquentes dans les autres hémopathies lymphoïdes chroniques B (183, 191, 251, 262, 283, 313). Les mutations de *CXCR4* constituent donc une des caractéristiques génomique de la MW.

CXCR4 contribue à l'établissement de l'interface fonctionnelle entre les cellules tumorales et leur microenvironnement en participant à la délivrance de signaux de survie et de domiciliation cellulaire (3, 271). Dans notre travail, nous avons recherché la relation entre le profil mutationnel de *CXCR4* et différents marqueurs d'expression membranaire. En effet, les mutations de *CXCR4* sont associées à une plus forte expression du récepteur par défaut de régulation du processus de désensibilisation (5, 21, 108). D'autre part, une expression de CXCR4 est observée dans la plupart des différentes hémopathies lymphoïdes B, et en particulier dans la LLC (45, 45, 232). Toutefois, le profil d'expression de CXCR4 varie selon le type de syndrome lymphoprolifératif et /ou la localisation des cellules tumorales (45, 46, 33, 107). Dans la MW, la première étude dans une cohorte de 10 patients n'a pas montrée de surexpression de CXCR4 par rapport à des lymphocytes B normaux (215). Dans notre étude de 53 patients, nous montrons l'expression de CXCR4 dans tous les MW. D'autre part, une forte variabilité du niveau d'expression de CXCR4 a été mise en évidence. Une augmentation significative de l'intensité d'expression de CXCR4 dans le groupe des MW mutés *CXCR4* indépendamment du type de mutation (non- sens ou *frameshift*) a été observée. Ce résultat confirme donc l'augmentation de l'expression de CXCR4 chez les MW *CXCR4^{Muté}* initialement rapportée dans

un groupe de 11 patients (260). Dans le syndrome de WHIM, les mutations altérant la fonction de ces différentes sérines et ou thréonines impliquées dans le processus de phosphorylation de CXCR4 sont observées (5, 21, 48). De façon intéressante, il a été montré que les mutations de *CXCR4* S338X diminuent la désensibilisation de CXCR4 et donc augmentent le niveau d'expression du récepteur, ce qui peut conduire à une capacité adhésive aberrante et à une rétention augmentée des cellules tumorales de MW dans les organes lymphoïdes (49, 199, 271, 260). Les mutations *CXCR4* entraînent une altération du profil de réponse à CXCL12 qui pourrait favoriser la dissémination des cellules tumorales comme cela a été montré dans le modèle murin (132, 260). L'impact de ces variants sur la stabilité ou le niveau d'expression de l'ARN n'est pas complètement élucidé. Toutefois, l'allèle muté *CXCR4* serait aussi plus transcrit que l'allèle sauvage (132). Ces données restent à confirmer mais suggéreraient l'existence d'un mécanisme d'échappement du processus de contrôle de qualité des ARN messagers (*NMD*, *Nonsense-mediated decay*). Ce dernier vise à éliminer les ARNs messager qui comportent un codon stop prématuré résultat soit d'une erreur de transcription ou d'épissage soit d'une mutation. Ce mécanisme permet d'éviter la production de protéines tronquées qui pourraient avoir un effet délétère pour la cellule de type dominant négatif par exemple (240B). La forme mutante de *CXCR4* est d'autre part capable d'altérer la fonction de la protéine sauvage par dimérisation (163). De nombreux mécanismes de régulation de l'expression et de la fonction de CXCR4 ont été rapportés : mobilisation du *pool* intracytoplasmique, absence de corrélation stricte entre le niveau d'expression membranaire et l'amplitude de la réponse à CXCL12, anomalies de désensibilisation,... (5, 271) CXCR4 peut aussi former un hétérodimère avec le récepteur CXCR7 qui a aussi pour ligand CXCL12 (91). L'étude de la relation entre le profil d'expression de CXCR7 et de la mutation de *CXCR4* pourrait être à envisager. En revanche, les études de séquençage complet du génome n'ont pas rapporté de mutation de CXCR7 dans la MW (131, 132, 299). CXCR4 est exprimé par les cellules tumorales chez tous les patients atteints de MW indépendamment du statut mutationnel *MYD88* et *CXCR4* (132) : le concept d'un ciblage thérapeutique de la protéine CXCR4 par antagoniste sélectif pourrait être développé. Différents antagonistes de CXCR4 (peptide, anticorps monoclonaux,...) sont disponibles : l'EPI-X4, le KRH-3955, le LY2510924, l'anticorps monoclonal BMS-936564/MDX-1338... (Annexe 3 : Antagonistes de CXCR4 en cours d'évaluation clinique). Le plerixaflor (AMD3100) est la molécule qui a été certainement la plus étudiée. Dérivé du bicyclam, il possède une activité d'antagoniste réversible et sélectif de CXCR4 en bloquant la liaison du récepteur à son ligand analogue. Initialement évalué dans le développement de stratégies thérapeutiques dans les infections HIV1, l'utilisation du plerixaflor a été approuvée par la FDA dans les protocoles de mobilisation des cellules souches dans les autogreffes (5, 176B, 196, 271). Différentes études dans le syndrome de WHIM ont montré l'intérêt de cette molécule (196, 197, 260). Son efficacité antitumorale a été observée dans un modèle murin de MW (197, 260). A ce jour, aucun essai n'est en cours dans la MW

alors que l'intérêt clinique du plerixaflor est en cours d'évaluation dans la LLC et le myélome (NCT00694590).

Une interaction fonctionnelle entre CXCR4 et l'intégrine VLA4/ CD49d a été décrite dans la MW (215). Le profil d'expression du CD49d est fortement associé au CXCR4, ce qui suggère une coordination entre les deux molécules dans le trafic des cellules tumorales. Nous avons donc recherché une relation entre le niveau d'expression du CD49d et le profil mutationnel de *CXCR4*. Aucune différence d'expression n'a été mise en évidence selon le statut mutationnel de *CXCR4*. En revanche, le groupe des MW sans mutation *MYD88L265P* est associé à une plus faible expression du CD49d. Le niveau du CD49d pourrait être modulé par la mutation *MYD88L265P* comme cela a été montré dans un modèle de DLBCL (215). Il a été également montré, dans la LLC, que le niveau d'expression du CD49d était associé au profil de réponse in vitro à l'ibrutinib et aux inhibiteurs de PI3K ce qui suggère la dépendance du CD49d à la voie médiée par BTK (70,118, 232). Une forte expression du CD49d est d'autre part considérée un facteur de pronostic défavorable dans la LLC et est corrélée à celle de CXCR4 (70, 71, 187). L'étude de l'impact clinique du niveau d'expression du CD49d reste à évaluer dans la MW.

Tout comme avec le CD49d, un lien fonctionnel entre CXCR4 et CD38 est suggéré par leur proximité au sein de la membrane plasmique impliquant l'existence d'un « invadosome » (74, 186). L'antigène CD38 fonctionne à la fois comme un récepteur et comme une ecto-enzyme. L'activation du CD38 conduit à l'activation de plusieurs cascades de signalisation intracellulaire qui peuvent varier selon le type cellulaire (74). Le principal ligand spécifique du CD38 est le CD31. La liaison du CD31 avec son récepteur conduit notamment à l'activation du complexe NFκB chez les lymphocytes B et est principalement impliquée dans la modulation de l'adhésion des leucocytes aux vaisseaux (45, 74). Le CD38 est considéré comme un marqueur de différenciation plasmocytaire comme le CD138. Le CD138 ou syndécan contribue aux processus d'interactions adhésives entre les cellules tumorales, la matrice extracellulaire et les cellules accessoires (290, 319). Dans notre série, aucune relation entre le statut mutationnel de *CXCR4* et CD38 n'a été observée. En revanche, dans le groupe des patients MW mutés *CXCR4*, une plus faible expression du CD138 a été mise en évidence. Il serait intéressant d'évaluer l'expression de ces différents marqueurs au niveau de la composante plasmocytaire du clone de MW. En effet, une diminution de l'expression de certains facteurs de transcription impliqués dans la différenciation plasmocytaire comme *BACH2* été par ailleurs rapportée chez les MW *CXCR4*^{Muté} (132, 330).

Une signature immunophénotypique CD22^{low}/CD25/CD27 a été décrite comme caractéristique de la MW (230, 231). La voie du CD27/CD70 est impliquée dans la physiopathologie

de la MW (122). Le CD27, marqueur des lymphocytes mémoires, est plus faiblement exprimé dans le groupe des MW *MYD88WT* (138, 246). Nous n'avons pas observé de différence d'expression du CD27 en fonction de la mutation *CXCR4*. Dans le syndrome de WHIM, une lymphopénie B est décrite. Une diminution des lymphocytes B mémoires CD27⁺ est en particulier rapportée (5, 108, 199). D'autre part, une altération du processus de commutation isotypique et de la différenciation des lymphocytes B en lymphocytes mémoires a été montrée dans le syndrome de WHIM (19). L'hypothèse d'une anomalie de migration de la zone sombre à la zone claire des lymphocytes B entre au sein du centre germinatif des ganglions a été évoquée. La survenue d'hémopathies lymphoïdes dans les syndromes de WHIM est par ailleurs décrite (58, 133).

D'autre part, notre étude en transcriptome a montré une altération du profil d'expression de plusieurs gènes jouant un rôle dans les mécanismes de migration cellulaire, de différenciation lymphocytaire ou de dégradation de la matrice extracellulaire comme MMP8 dans la MW (65, 110, 329). L'ensemble de ces données suggéreraient que les mutations de *CXCR4* pourraient modifier la capacité des cellules tumorales à interagir dans le microenvironnement médullaire dans la MW et donc de favoriser l'égression des cellules malignes (45, 46). Notre étude n'a pu être réalisée que dans un nombre très restreint de patients faute de matériel disponible. L'analyse transcriptomique des lignées MW mutées *CXCR4* a montré une signature impliquant des gènes associés à la prolifération cellulaire (132, 260). L'étude du profil transcriptomique des mutations de *CXCR4* par *RNA seq* a été récemment menée dans une cohorte de 57 patients. Une signature montrant la surexpression de gènes impliqués dans la voie de signalisation associée à *CXCR4*, une diminution des gènes de différenciation lymphoïde B et des gènes régulés par la mutation *MYD88L265P* est observée. Une activation de la voie du TLR7 a été mise en évidence alors que la voie des TLR4 est régulée négativement (132). Cette étude a d'autre part rapporté une diminution de l'expression de différentes protéines G impliquées dans les mécanismes de chimiotactisme et de régulateurs négatifs de la voie des MAPK. Ce profil correspond à celui décrit par une approche de quantification en PCR en temps réel d'un panel de gènes (260). Une dérégulation de la voie des MAPK, PI3K et BTK a été montrée dans le groupe des MW mutés *CXCR4* ce qui pourrait jouer un rôle dans le profil de chimiorésistance à ibrutinib caractérisant ce groupe de patients (49, 260, 302B).

Nous avons ensuite cherché à décrire l'architecture clonale et le paysage mutationnel associés des MW mutés *CXCR4* en analysant différents gènes impliqués dans la voie des TLR, Ras ou du BCR, voies connues pour établir des interactions fonctionnelles avec l'axe CXCL12 et *CXCR4* dans les lymphocytes B normaux ou tumoraux (61). Il a été montré l'impact de la signalisation médiée par *CXCR4* dans l'activation de BTK (33, 107, 118). Dans notre étude, les mutations de *CXCR4* sont principalement observées dans le groupe des MW avec mutations *MYD88L265P* comme initialement

rapporté (131, 300). L'hypothèse d'une coopération fonctionnelle entre l'axe CXCL12/CXCR4 et la voie des TLR peut être avancée (61). Toutefois, une dualité des signatures transcriptionnelles CXCR4/MYD88 a été récemment décrite (131, 132). Les mutations de *CXCR4* pourraient participer à l'activation d'autres voies de signalisation comme AKT et ERK et donc favoriser la chimiorésistance des cellules tumorales à certaines thérapies ciblées comme l'ibrutinib ou les inhibiteurs de PI3K (49, 260). Des études fonctionnelles complémentaires sont à envisager pour caractériser les interactions *MYD88L265P*/mutation *CXCR4* dans la MW.

L'étude en NGS des mutations *MYD88L265P* et de *CXCR4* a permis, par l'interprétation des fréquences alléliques ou VAF, d'envisager l'analyse de l'architecture clonale de ces variants dans la MW. D'autre part, le NGS, de par sa sensibilité, peut identifier d'éventuels micro sous clones présents à une fréquence de l'ordre de 1%. Le caractère clonal ou sous clonal d'une mutation est donc plus facile à analyser par rapport au séquençage Sanger. Dans notre étude, un sous clone muté *CXCR4* a été observé dans près de un tiers des cas de notre série de 14 patients. La comparaison avec la fraction mutationnelle de *MYD88L265P* suggérerait que *CXCR4* pourrait être un événement secondaire dans la MW. L'équipe de S.Treon a récemment rapporté des profils mutationnels comparables en comparant les résultats de quantification des mutations *MYD88L265P* et *CXCR4* par PCR en temps réel (335). Dans environ un tiers des cas, des sous clones mutés *CXCR4* sont observés dans la MW. D'autre part, l'analyse de la fraction clonale dans les MGUS-IgM a montré que la mutation *CXCR4 S338X* était sous clonale par rapport à la mutation *MYD88L265P* (335). Dans les syndromes lymphoprolifératifs indolents comme la MW, le caractère primaire ou secondaire d'une anomalie est parfois difficile à définir. En effet, la date de diagnostic correspond parfois plus à la date de l'exploration biologique ayant conduit au diagnostic qu'à l'« âge » réel du clone tumoral qui a pu évoluer sans retentissement clinique durant plusieurs années. La caractérisation génomique longitudinale des MW asymptomatiques qui progressent en phase symptomatique est donc indispensable pour mieux comprendre les facteurs génomiques d'évolution clinique. L'étude séquentielle du profil mutationnel de *CXCR4* associée à l'évolution clinique des patients permettra de définir la dynamique de l'architecture clonale dans la MW et de préciser le caractère « *driver* » ou « passager » de ces mutations. En effet, dans de nombreux modèles, une dynamique de l'architecture clonale, parfois complexe, est décrite définissant différents modèles d'évolution soit linéaire avec acquisition successive d'événement dans le clone dominant ou branché. D'autre part, une « mosaïque » de clones tumoraux composée de cellules partageant un événement génétique fondateur, mais distribué dans différents sous-clones possédant chacun un génotype dominant propre, participerait à l'émergence d'une hétérogénéité intra clonale. L'évolution de ces différentes sous-populations tumorales pourrait suivre un modèle Darwinien par acquisition stochastique d'événements génétiques de type UPD, CNA et mutations (161, 161B). La progression clonale pourrait donc être modélisée comme un processus dynamique et évolutif, caractérisé par une diversité génétique intra-

clonale et la sélection d'un sous clone ayant un avantage de survie ou de prolifération. Cette modification de l'architecture de la population tumorale pourrait ainsi contribuer au passage d'un stade asymptomatique et indolent à une phase symptomatique ou à une rechute après traitement par pression de sélection chimio induite. Le rôle joué par les mutations de *CXCR4* dans ce scénario reste à définir.

Une coopération fonctionnelle entre la voie des TLR et du BCR a été décrite (325, 326). D'autre part, une activation de la voie du BCR a été récemment rapportée dans la MW et conduit à l'activation de BTK (10). Une hétérogénéité de profils de réponse *in vitro* à la stimulation du BCR a été par contre mise en évidence (10). Dans notre étude, nous n'avons pas observée de co-occurrence de mutation de *CXCR4* avec celles de la voie du BCR (*CD79A/ CD79B*) ce qui suggérerait l'existence de 2 groupes de MW *MYD88L265P* présentant des mutations soit de la voie *CXCR4* soit de la voie du BCR. En effet, un sous clone muté *CXCR4* a été identifié chez un seul patient présentant une mutation *MYD88L265P* et *CD79BY196N* au diagnostic. L'étude du profil mutationnel lors de la progression au stade symptomatique a montré la disparition du sous clone muté *CXCR4*. L'analyse des fractions alléliques associées à l'évolution clonale, dans ce cas, suggère l'existence de 2 clones différents au diagnostic : un clone *MYD88L265P/ CD79B* majoritaire et un clone minoritaire *MYD88L265P/ CXCR4^{Muté}*. Les mutations de la voie du BCR, localisées dans le domaine ITAM, ont été identifiées dans la MW à une fréquence de l'ordre de 10 % exclusivement dans le groupe des patients mutés *MYD88L265P* (131, 132, 248). Leur rôle physiopathologique n'a pas été exploré dans la MW. Aucune signature transcriptionnelle caractérisant les MW mutés *CD79B* n'a été décrite dans les études du transcriptome (132). Les variants somatiques du *CD79A/CD79B* sont toutefois comparables à ceux initialement observés dans les lymphomes à grandes cellules B de type ABC et touchent principalement le codon codant pour la tyrosine en position 196 du *CD79B* (73). Le même profil d'association des mutations de *MYD88* et du *BCR* est rapporté dans les lymphomes à grandes cellules B de type ABC, en particulier dans les lymphomes cérébraux primitifs (73, 149, 250). Les mutations de *CXCR4* sont en revanche rares dans les DLBCL (183, 260). Récemment, il a été montré un taux de réponse plus élevé à l'ibrutinib dans le groupe de DLBCL mutés *MYD88/BCR* suggérant l'existence d'une létalité synthétique dans ce modèle (318, 322). En effet, certaines mutations pourraient être des événements *driver* mais, dans certaines conditions, pourraient induire un profil de sensibilité spécifique à des inhibiteurs d'une voie de signalisation connexe. L'impact pronostique des mutations du BCR (*CD79A/CD79B*) dans le cadre d'un traitement conventionnel ou ciblé n'a pas été exploré à ce jour dans la MW.

La kinase BTK se situe au carrefour des voies des TLR, du BCR et l'axe *CXCL12/CXCR4* (10, 61). Dans notre étude, l'identification de deux groupes génomiques basées sur le profil BCR et *CXCR4* dans la MW suggérerait l'existence de deux sous-groupes fonctionnels dont les mutations additionnelles pourraient moduler le profil d'activation de la voie des TLR constitutionnellement

activés par la mutation *MYD88L265P* (49, 323). L'hypothèse suivante pourrait être avancée. Le variant *MYD88L265P* est une mutation initiatrice dans la MW qui promeut l'activation constitutive de la voie des TLR, JAK /STAT3 et NFκB (7, 246, 323). Les mutations de *CXCR4* ou du *BCR* pourraient constituer un des événements secondaires qui activerait d'autres voies de signalisation ou modifierait l'interaction de la cellule tumorale avec son microenvironnement. Dans un modèle de MW avec mutation *CXCR4*, l'effet de CXCL12 est en effet inhibé en présence d'agents ciblant spécifiquement MYD88 ce qui suggère le rôle prépondérant de cette mutation dans l'oncogénèse de la MW (51). La nécessité de la coopération de plusieurs anomalies dans le développement d'un processus oncogénique associé à la mutation *MYD88L265P* a été d'autre part montrée (145, 314). L'association de mutations pourrait contribuer à influencer le statut de chimiosensibilité ou de chimiorésistance des cellules tumorales dans ces différents sous-groupes en particulier dans un contexte de thérapeutique ciblée comme l'ibrutinib (318, 322). Une caractérisation mutationnelle précise des MW sera sans doute utile pour orienter la décision thérapeutique dans la MW. Les inhibiteurs de Bcl2 ont montré par exemple leur intérêt dans des essais précliniques dans les MW avec mutation *CXCR4* (52).

L'analyse génomique en puces à SNP a permis la description exhaustive des anomalies génomiques dans la MW (116, 231, 248). L'existence de nouvelles anomalies cryptiques (microdélétions par exemple) et de disomies uniparentales acquises a été ainsi mise en évidence (231, 248). Dans notre étude, nous avons cherché à identifier un profil génomique en puces à SNP permettant de caractériser le groupe des patients avec mutations *CXCR4*. Nous avons montré une complexité plus importante des caryogrammes, une plus forte incidence de certaines anomalies comme le gain du chromosome 4, les délétions 6q et les gains en Xq. Le rôle pronostique de ces anomalies n'est pas défini (40, 218, 221). Toutefois, certaines anomalies comme la trisomie 4 sont associées aux présentations symptomatiques au diagnostic des MW et se caractérisent par une signature transcriptionnelle (38, 39, 132, 218). D'autre part, les formes symptomatiques de MW sont caractérisées par une complexité génomique plus importante se traduisant par une fréquence élevée de plus de 3 anomalies en puces à SNP (231, 248). L'ensemble de ces données suggérerait donc l'existence d'une hétérogénéité inter et intra clonale dans la MW selon le profil mutationnel et génomique sur la base du statut mutationnel de *CXCR4*. Différents sous-groupes de MW *MYD88L265P* sont donc identifiés. Le rôle de l'association des différentes anomalies en termes de risque de progression du stade asymptomatique au stade symptomatique, de pronostic clinique ou de chimiorésistance reste à évaluer.

Nous avons ensuite analysé le profil clinico biologique des patients MW selon leur statut mutationnel *CXCR4*. Sur le plan de la présentation au diagnostic, des critères de mauvais pronostic sont associés aux mutations de *CXCR4*. Dans ce groupe de patients, des taux d'IgM plus élevés sont observés ainsi qu'une fréquence plus importante de thrombopénie. Dans le score pronostique de

l'IPSSWM, le taux d'IgM supérieur à 70g/l constitue un facteur pronostic indépendant (205). Aucune relation avec les autres facteurs biologiques pronostiques n'a été observée et en particulier la lymphocytose ou les localisations extramédullaires. Une association entre l'importance de l'infiltration médullaire, une thrombopénie et les mutations de *CXCR4* a été précédemment décrite (275, 300). Le degré d'infiltration de la BOM ou l'importance de la mastocytose médullaire n'a pas été évalué dans notre cohorte en raison de l'absence de prélèvements dans certains cas ou de données principalement disponibles dans le groupe des patients symptomatiques au diagnostic. Une mutation de *CXCR4* avait été décrite chez 4 des 10 patients présentant une localisation extramédullaire dans l'étude menée par l'équipe d'A. Roccaro (260). Cette présentation clinique des patients correspondait à la dissémination au niveau du rein et du poumon observée dans le modèle murin de la mutation *C1013G* de *CXCR4*. Aucun cas de mutation *CXCR4* n'avait été en revanche rapporté dans le syndrome de Bing Neel par notre groupe (249). Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires associés à la dissémination des cellules tumorales dans la MW.

Nous avons recherché l'impact pronostique clinique en termes de survie globale des mutations de *CXCR4* dans notre cohorte de 93 patients non protocolaire. Nous n'avons pas mise en évidence de rôle pronostique de cette mutation sur la survie globale. Dans une cohorte de 175 patients avec un suivi médian d'environ 5 ans, l'équipe de S. Treon n'a pas montré de différence significative en termes de survie globale ni de survie sans événement en fonction du statut mutationnel de *CXCR4* malgré la fréquence plus élevée de la mutation dans les formes symptomatiques au diagnostic (300). L'impact pronostique des mutations de *CXCR4* a été évalué dans des séries rétrospectives hétérogènes sur le plan des différentes lignes de traitements. Une validation protocolaire de la valeur pronostique de *CXCR4* mais aussi de *MYD88L265P* est à envisager. En revanche, la présence de mutation serait associée à un délai de traitement plus court dans notre étude ce qui suggérerait que la mutation *CXCR4* soit un facteur de progression de la MW d'une phase asymptomatique vers une phase symptomatique nécessitant la mise en place d'une chimiothérapie. Ces données doivent être validées par l'analyse de cohortes indépendantes. D'autre part, une étude longitudinale du profil mutationnel de *CXCR4* est envisagée par notre groupe. A ce jour, les déterminants biologiques et génomiques de cette évolution clinique asymptomatique/ symptomatique sont en effet peu connus (79, 231, 303).

L'impact clinique de *CXCR4* a été principalement décrit dans le cadre de thérapie ciblée. Dans des études précliniques, il a été montré le rôle des mutations *CXCR4* (*C1013G*) ou de certaines mutations frameshift dans la résistance à différents agents pharmacologiques tels que la bendamustine, les inhibiteurs de BTK, mTOR et PI3K (49, 50, 260). Ces résultats ont été partiellement confirmés dans des protocoles thérapeutiques (302B). En effet, les résultats de l'essai évaluant l'intérêt de l'ibrutinib dans une cohorte de 63 MW en rechute ou réfractaire ont montré un plus faible taux de réponse dans le groupe des patients mutés *CXCR4*. Les inhibiteurs du protéasome ne présentent pas de

variations importantes de leur profil de sensibilité selon le statut mutationnel de *CXCR4* (49, 260). Lors des études évaluant l'intérêt d'associations comprenant du bortezomib, l'impact des mutations de *CXCR4* n'a pas été étudié (78). En revanche, dans le cadre d'essais récents évaluant différentes associations avec les nouveaux inhibiteurs du protéasome comme le carfizomib, les taux de réponse observés étaient indépendants du statut mutationnel de *CXCR4* sous réserve, toutefois, des faibles effectifs analysés. Une autre piste de traitement dans le groupe des MW *CXCR4*^{Muté} serait les inhibiteurs de Bcl2 (301). A ce jour, les recommandations internationales issues des différents groupes de travail d'experts ne considèrent pas la mutation *CXCR4* comme stratifiante dans le choix thérapeutique en raison des données cliniques qui restent préliminaires (57). Il conviendra d'initier toutefois rapidement une réflexion sur un schéma thérapeutique personnalisé basé sur le profil mutationnel de *CXCR4* dans la MW.

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, une mutation de *CXCR4* est observée dans environ 25% des MW. Les mutations identifiées conduisent toutes à une modification du domaine C terminal de la protéine *CXCR4* qui joue un rôle important dans la régulation de l'activité du récepteur. L'étude en NGS du statut mutationnel de *CXCR4* couplée à celui de la mutation *MYD88L265P* et du *CD79A/B* a montré l'existence d'une hétérogénéité intraclonale et interclonale du profil mutationnel du *BCR* et de *CXCR4* au sein du clone muté *MYD88L265P*. Une signature clinico-biologique, génomique et transcriptionnelle a été identifiée dans le groupe des MW *CXCR4*^{Muté}. Cette étude suggère donc une hétérogénéité génomique de la MW au-delà de l'actuelle classification clinique qui distingue le groupe des MW asymptomatiques des MW symptomatiques présentant des critères d'initiation de traitement.

Pour mieux comprendre les événements oncogéniques impliqués dans l'évolution clinique d'une hémopathie, des techniques de séquençage à haut débit peuvent être utilisées pour étudier l'évolution clonale par analyse longitudinale des anomalies génomiques pour un même patient. Notre équipe a initié une étude séquentielle du profilage génomique de la MW par puces à SNP pour cartographier les locus altérés soit par variation de nombre de copie soit par UPD dans une cohorte de 25 patients. Notre analyse a permis de différencier les patients asymptomatiques et stables des patients progressifs ou en rechute après traitement par leurs profils génomiques (données non publiées). Aucune variation à l'échelle des puces à SNP n'était observée dans le groupe des patients asymptomatiques et stables au cours du temps. En revanche, dans le groupe des patients progressifs ou rechutant après traitement, une évolution clonale était observée dans environ 50% des cas. La survenue d'événements génomiques sera aussi évaluée dans un groupe de patients asymptomatiques qui progressent vers une phase symptomatique. Au regard du profil mutationnel de *MYD88L265P*, *CXCR4*, *CD79A* et *CD79B* mis en évidence dans ce travail, une analyse séquentielle en NGS ciblé est prévue pour disséquer l'architecture clonale au cours de l'évolution clinique et corréler ces données aux variations du profil observé en puces à SNP.

L'analyse du séquençage complet du génome dans la MW a identifié les mutations d'*ARID1A* comme le troisième type de mutation la plus fréquente dans la MW. *ARID1A* participe aux mécanismes de remodelage de la chromatine et est considéré comme un gène suppresseur de tumeur dans différents cancers. Une étude en NGS a été réalisée pour évaluer l'incidence des mutations d'*ARID1A* dans notre cohorte. Des difficultés de séquençage de l'exon 1 ont conduit à la réalisation du séquençage en Sanger pour l'ensemble des 53 patients. Le caractère somatique des variants observés a

été vérifié. Les résultats préliminaires confirment une fréquence de l'ordre de 10% dans la MW. La recherche de délétion d'*ARID1a* est en cours ainsi que l'analyse du profil d'expression de l'ARN et de la protéine. Une analyse intégrative du profil mutationnel et génomique est prévue afin de préciser les caractéristiques des altérations d'*ARID1a* dans la MW.

Alors que le paysage génomique des MW *MYD88L265P* s'est précisé, une question reste en suspens concernant l'analyse des MW sans mutation *MYD88L265P*. S'agit-il d'un sous groupe particulier de MW ou d'un autre type de syndrome lymphoprolifératif ? Nous disposons d'une série de 15 patients qui ont pu être caractérisés en puces à SNP. Nous poursuivons donc l'interprétation des résultats d'un panel NGS comprenant 23 gènes pour explorer le panorama mutationnel de ce groupe de MW. Une « mini-signature transcriptionnelle » basée sur les résultats publiés en RNASeq par l'équipe de S. Treon est en cours de réalisation.

L'ensemble de ces travaux devrait nous permettre de mieux caractériser différents sous groupes génomiques existant dans la MW et d'identifier les événements impliqués dans la progression tumorale dans la MW.

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Adamia S, Reichert A, Kuppusamy H, Kriangkum J, Ghosh A, Hodges J et al : Inherited and acquired variations in the hyaluronan synthetase 1 (HAS1) gene may contribute to disease progression in multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, 2008, 112(13): 5111-21
2. Anagnostopoulos A, Eleftherakis-Papaiakovou V, Kastiris E, Tsionos K, Bamias A, Meletis J, et al : Serum concentrations of angiogenic cytokines in Waldenström macroglobulinaemia: the ration of angiopoietin-1 to angiopoietin-2 and angiogenin correlate with disease severity. *Br. J. Haematol.* 2007, 137(6):560-8
3. Anders H, Romagnani P, Mantovani A: Pathomechanisms homeostatic chemokines in health, tissue regeneration, and progressive diseases. *Trends in Molecular Medecine*, 2014, 20(3): 154-65
4. Algara P, Mateo MS, Sanchez-Beato M, Mollejo M, Navas IC, Romero L, et al : Analysis of the IgV(H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood*. 2002, 99(4):1299-304.
5. Al Ustwani O, Kurzrock R, Wetzler M.: Genetics on a WHIM. *Br J Haematol.* 2014,164(1):15-23.
6. 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.* 2010 sept;85(9):824-33
7. Ansell S, Hodge L, Secreto F, Manske M, Braggio E, Price-Troska T et al : Activation of TAK1 by MYDL265P drives malignant B-cell growth in non-Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer Journal*, 2014, 4:e183
8. Arcaini L, Rossi D, Paulli M: Splenic marginal zone lymphoma : from genetics to management. *Blood*, 2016, 127, 17 :2072-2081
9. Arcaini L, Varettoni M, Boveri E, Orlandi E, Rattotti S, Zibellini S, et al : Distinctive clinical and histological features of Waldenström's macroglobulinemia and splenic marginal zone lymphoma. *Clinical lymphoma, Myeloma & leukemia*, 2011, 11 (1):103-105.
10. Argyropoulos K, Vogel R, Ziegler C, Altan-Bonnet G, Velardi E, Calafiore M et al : Clonal B cells in Waldenström's macroglobulinemia exhibit functional features of chronic active B-cell receptor signaling. *Leukemia*, 2016, 30(5):1116-25
11. Avbelj M, Wolz O, Fekonja O, Bencina M, Repic M, Mavri J, Kruger J, et al : Activation of lymphoma-associated MyD88 mutations via allosterity-induced TIR-domain oligomerization. *Blood*, 2014, 124(26), 3896-3904
12. Avet-Loiseau H, Garand R, Lode L, Harousseau JL, Bataille R, Intergroupe Francophone du Myelome: Translocation t(11;14)(q13;q32) is the hallmark of IgM, IgE, and nonsecretory multiple myeloma variants. *Blood*, 2003, 101 (4):1570-1571
13. Avet-Loiseau H, Garand R, Lodé L, Robillard N, Bataille R: 14q32 Translocations discriminate IgM multiple myeloma from Waldenström's macroglobulinemia. *Semin. Oncol.* 2003, 30(2):153-5

14. Azab F, Azab A, Maiso P, Calileri T, Flores L, Liu Y et al : Eph-B2/ ephrin-b2 interaction plays a major role in the adhesion and proliferation of Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Cancer res*, 2012, 18(1):4 91-104
15. Azab A, Azab F, quang P, Maiso P, Sacco A, Ngo H et al : FGFR3 is overexpressed in Waldenström macroglobulinemia and its inhibition by dovitinib induces apoptosis and overcomes stroma-induced proliferation. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(13):4389-99
16. Baehring JM, Hochberg EP, Raje N, Ulrickson M, Hochberg FH: Neurological manifestations of Waldenström macroglobulinemia. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008, 4(10):547-56.
17. Babbage G, Townsend M, Zojer N, Mockridge IC, Garand R, Barlogie B, et al : IgM-expressing Waldenström's macroglobulinemia tumor cells reveal a potential for isotype switch events in vivo. *Leukemia*.2007, 21(4):827-30.
18. Baldini L, Goldaniga M, Guffanti A, Broglia C, Cortelazzo S, Rossi A, et al : Immunoglobulin M monoclonal gammopathies of undetermined significance and indolent Waldenström's macroglobulinemia recognize the same determinants of evolution into symptomatic lymphoid disorders: proposal for a common prognostic scoring system. *J. Clin. Oncol.* 2005, 1 20, 23(21):4662-8.
19. Banwait R, O'Regan K, Campigotto F, Harris B, Yazar D, Bagshaw et al : The role of 18 F-FDG PET/ CT imaging in Waldenström macroglobulinemia. *Am J hematol*, 2011, 86:567-572
20. Banwait R, Aljawai Y, Cappuccio J, McDiarmid S, Morgan EA, Leblebjian H, et: Extramedullary Waldenström macroglobulinemia. *American journal of Hematology*, 2015, 90(2):100-4
21. Balabanian K, Lagane B, Pablos J, Laurent L, Planchenault T, Verola O, et al : WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by the impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood*, 2005, 105:2449-2457
22. Balabanian K, Brotin E, Biajoux V, Bouchet-Delbos L, Lainey E, Fenneteau O, et al : Proper desensibilisation of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice. *Blood*, 2012, 119(24): 5722-30
23. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton L, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al : Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2015, 29(2):329-36
24. Ballester L, Loghavi S, Kanagal-Shamanna R, Barkoh B, Lin P, Medeiros J, et al : Clinical validation of a CXCR4 mutation screening assay for Waldenström macroglobulinemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 2016, in press
25. Bario S, Shanafelt T, Ojha J, Chaffe K, Secreto C, Kortum K, et al : Genomic characterisation of high-count MBL cases indicates that early detection of driver mutations and subclonal expansion are predictors of adverse clinical outcome. *Leukemia*, 2016, DOI:10.1038/leu/2016.172
26. Baseggio L, Traverse-Glehen A, Petinataud F, Callet-Bauchu E, Berger F, Ffrench M, et al : CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica*. 2010, 95(4):604-12.

27. Beaussant Cohen S, Fenneteau O, Plouvier E, Rohrlich P, Daltroff G, Plantier I et al : Description and outcome of a cohort of 8 patients with WHIM syndrome from the French severe chronic, : neutropenia registry. *Orphanet J Rare Dis*, 2012,
28. Berger F, Traverse-Glehen A, Felman P, Callet-Bauchu E, Baseggio L, Gazzo S, et al : Clinicopathologic features of Waldenström's macroglobulinemia and marginal zone lymphoma: are they distinct or the same entity? *Clin Lymphoma*. 2005,5(4):220-4.
29. Berger R, Nguyen Khac F: Chromosomal abnormalities and Waldenström macroglobulinemia. *Pathol Biol(Paris)*, 2008, 56(6):400-06
30. Besse L, Sedlarikova L, Kryukov F, Nekvindova J, Radova L, Almasi M et al : Combination of serum microRNA-320a and microRNA-320b as marker for Waldenström macroglobulinemia? *Am J Hematol*, 2015, 90(3):E51-52
31. Beutler BA: TLRs and innate immunity. *Blood*, 2009,113(7):1399-407
32. Blachly J, Baiocchi R: Targeting Pi3-kinase (PI3K), Akt and mTOR axis in lymphoma. *British Journal of Haematology*, 2014, 167:19-32
33. Bleul C, Schultze JL, Springer T: B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. *J Exp Med*, 1998, 187(5):753-62
34. Bohers E, Mareschal S, Bouzelfen A, Marchand V, Ruminy P, Maingonnat C, et al : Targetable activating mutations are very frequent in GCB and ABC diffuse large B-cell lymphoma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2014, 144-153
35. Bohers E, Mareschal S, Bertrand P, Viailly P, Dubois S, Maingonnat C, et al : Activating somatic mutations in diffuse large B-cell lymphomas: lessons from next generation sequencing and key elements in the precision medicine era. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(5):1213-22
36. Bojarczuk K, Bobronwicz M, Dwojak M, Miazak N, Zapala P, Bunes A, et al : B-cell receptor signaling in the pathogenesis of lymphoid malignancies. *Blood Cells, molecules and diseases*, 2015, 255-265
37. Boyle E, Manier S, Lejeune J, Fouquet G, Guidez S, Bonnet S et al : IgMk and IgMI measurements for the assessment of patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Cancer Res*, 2016, in press
38. Braggio E, Keats JJ, Leleu X, Van Wier S, Jimenez-Zepeda VH, Valdez R, et al : Identification of copy number abnormalities and inactivating mutations in two negative regulators of nuclear factor-kappaB signaling pathways in Waldenström's macroglobulinemia. *Cancer Res*. 2009,15, 69(8):3579-88.
39. Braggio E, Dogan A, Keats JJ, Chng WJ, Huang G, Matthews JM, et al : Genomic analysis of marginal zone and lymphoplasmacytic lymphomas identified common and disease-specific abnormalities. *Mod Pathol*, 2012, 25 (5):651-660.
40. Braggio E, Philipsborn C, Novak A, Hodge L, Ansell S, Fonseca R: Molecular pathogenesis of Waldenström macroglobulinemia. *Haematologica*. 2012, 97(9):1281-90

41. Brisou G, Verney A, Wenner T, Baseggio L, Felman P, Callet Bauchu E, et al : A restricted IgVH gene repertoire in plenic marginal zone lymphoma is associated with autoimmune disorders. *Haematologica*, 2014, 99(10):e197-8
42. Brown R, Kabani K, Favaloro J, Yang S, Ho P, Gibson J, et al : CD86+ or HLA-G+ can be transferred via trogocytose from myeloma cells to T cells and are associated with poor prognosis. *Blood* 2012, 120(10): 2055-63
43. Bruscaggin A, Monti S, Arcaini L, Ramponi S, Lucioni M, Paulli M, et al : Molecular lesions of signalling pathway genes in clonal B-cell lymphocytosis with marginal zone features. *Br Journal of Haematology*, 2014, 167: 719-720
44. Burger JA, Burger M, Kipps TJ: Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*, 1999, 94(11):3658-67.
45. Burger J, Kipps T: CXCR4: a key receptor in the cross talk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*, 2006, 105(5): 1761-67
46. Burger JA, Gribben JG: The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol.* 2014, 24:71-81.
47. Buske C, Leblond V: How to manage Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia*, 2013, 27(4):762-72
48. Busillo J, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic J: Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285, 10:7805-7817
49. Cao Y, Hunter ZR, Liu X, Xu L, Yang G, Chen J, et al : The WHIM-like CXCR4S338X somatic mutation activates AKT and ERK, and promotes resistance to ibrutinib and other agents used in the treatment of Waldenström's Macroglobulinemia. *Leukemia* 2015; 29: 169-76.
50. Cao Y, Yang G, Hunter Z, Liu X, Xu L, Chen J et al : The BCL2 antagonist ABT-199 triggers apoptosis, and augments ibrutinib and idelalisib mediated cytotoxicity in CXCR4 Wild type and CXCR4 WHIM mutated Waldenström macroglobulinemia cells. *Br J Haematol*, 2015, 170: 123-138
51. Cao Y, Hunter ZR, Liu X, Xu L, Yang G, Chen J, et al : CXCR4 WHIM-like frameshift and nonsense mutations promote ibrutinib resistance but do not supplant MYD88(L265P) -directed survival signalling in Waldenström macroglobulinaemia cells. *Br J Haematol.* 2015;168(5):701-7.
52. Cao Y, Yang G, Hunter Z, Liu X, Xu L, Chen J, Tasamaklis N et al : The bcl2 antagonist ABT-199 triggers apoptosis and augments ibrutinib and idelalisib mediated cytotoxicity in CXCR4 wild-type and CXCR4 WHIM mutated Waldenström macroglobulinemia. *Br J Haematol*, 2015, 170(1): 134-8
53. Caruz A, Samsom M, Alonso J M., Alcamí J, Baleux F, Virelizier J. L., et al : Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. *FEBS Lett*, 1998, 426: 271-278, 1998.

54. Castillo JJ, D'Sa S, Lunn M, Minnema MC, Tedeschi A, Lansigan F, et al : Central nervous system involvement by Waldenström macroglobulinemia (Bing Neel syndrome): a multi-institutional retrospective study. *British Journal of Haematology*, 2016, 172 (5): 709-15
55. Castillo J, Olszewski A, Cronin A, Hunter Z, Treon S: Survival trends in Waldenström macroglobulinemia: an analysis of the the Surveillance, Epidemiology and End Resultats database. *Blood*, 2014, 123:3999-4000
56. Castillo J, Olszewski A, Kanan S, Meid K, Hunter Z, Treon S: Overall survival and competing risks of death in patients with Waldenström macroglobulinemia: an analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Resultats database. *British Journal of Heamatology*, 2015, 169(1): 81-9
57. Castillo J, Garcia-Sanz R, Hatjiharissi E, Kyle R, Leleu X, Mc Master M, et al : Recommendations for the diagnosis and initial evaluation of patients with Waldenström macroglobulinemia: a task force from the 8th international Workshop on Waldenström macroglobulinemia. *British Journal of Haematology*, 2016, DOI:10.1111/bjh.14196
- 57B. Castillo J, Gustine J, Meid K, Dubeau T, Hunter Z, treon S: Histological transformation to diffuse large B-cell lymphoma in patients with Waldenström macroglobulinemia. *Am. J. Hematol.* 2016, DOI:10.1002/ajh.24477
58. Chae KM, Ertle JO, Tharp MD. B-cell lymphoma in a patient with WHIM syndrome. *J Am Acad Dermatol* 2001; **44**: 124–128.
59. Chakraborty R, Novak A, Ansell S, Muchtar E, Kapoor P, Hayman S, et al : First report of MYD88L265P somatic mutation in IgM-associated light chain amyloidosis. *Blood*, 2016 ahead print.
60. Chang H, Qi X, Xu W, Reader JC, Ning Y: Analysis of 6q deletion in Waldenström macroglobulinemia. *Eur. J. Haematol.* 2007, 79(3):244-7.
61. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S: The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res.* 2014, 124:31-82
62. Chen C, Kouroukis T, White D, Voralia M, Stadtmauer E, Stewart K, et al : Bortezomib is active in patients with untreated or relapsed Waldenström' macroglobulinemia: a phase II study of the National Cancer institute of Canada Clinical trials groups. *Journal of Clinical Oncology*, 2007, 25:1570-1575
63. Chen C, Kouroukis C, White D, Vorolia M, Stadtmauer E, Stewart K, et al : Bortezomib is active in patients with untreated or relapsed Waldenström' macroglobulinemia: a phase II study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials group. *Journal of Clinical Oncology*, 2007, 25 (12): 1570-1575
64. Chen S, Chang B, Chang S, Tong T, Ham S, Sherry B, Burger J, Rai K, Chiorazzi N: BTK inhibition results in impaired CXCR4 chemokine receptor surface expression, signaling and function in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2015, 30(4):833-43
65. Chng WJ, Schop RF, Price-Troska T, Ghobrial I, Kay N, Jelinek DF, et al : Gene-expression profiling of Waldenström macroglobulinemia reveals a phenotype more similar to chronic lymphocytic leukemia than multiple myeloma. *Blood*. 2006,15,108(8):2755-63.
66. Chung S, Kim E, Park J, Chung Y, Lito P, Teruya-Feldstein J, et al . Hematopoietic stem cell origin of BRAF6V600E mutations in hairy cell leukemia. *Sci Transl Med*, 2014, 6(238):238ra71

67. Ciccarelli BT, Patterson CJ, Hunter ZR, Hanzis C, Ioakimidis L, Manning R, et al : Hepcidin is produced by lymphoplasmacytic cells and is associated with anemia in Waldenström's macroglobulinemia. *Clinical lymphoma, Myeloma & leukemia*, 2011,11 (1):160-163.
68. Clipson A, Wang M, de laval L, Anshton-Key M, Wotherspoon A, Vassiliou G et al : KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype. *Leukemia*, 2015, 29(5):1177-85
69. Conley-LaComb MK, Saliganan A, Kandagatla P, Chen YQ, Cher ML, Chinni SR: PTEN loss mediated Akt activation promotes prostate tumor growth and metastasis via CXCL12/CXCR4 signaling. *Mol Cancer*. 2013;12(1):85.
70. Dal Bo M, Tissino E, Benedetti D, Caldana C, Bomben R, Del Poeta G, et al : Microenvironmental interactions in chronic lymphocytic leukemia: the master role of CD49d. *Semin Hematol*. 2014 Jul;51(3):168-76
71. Dal Bo M, Bulian P, Bomben R, Zuchetto A, Rossi F, Pozzo F et al : CD49d prevails over the novel recurrent mutations as independent prognosticator of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2016, 1- 8, DOI:10.1038/leu.2016.88
72. Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, et al : Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discovery*, 2014, 4(9): 1088-101
73. Davies R, Ngo V, Lenz G, Tolar P, Young R, Romesser P, et al : Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 2010, 436:88-92
74. Deaglio S, Vaisitti T, Zuchetto A, Gattei V, Malavasi F: CD38 as a molecular compass guiding topographical decisions of chronic lymphocytic leukemia cells. *Semin. Cancer Biol*, 2010,20(6):416-23.
75. De Rooij M, Kuil A, Kraan W, Kersten M, Treon S, Pals S et al : Ibrutinib and idelalisib target B cell receptor but not CXCL12/CXCR4-controlled integrin-mediated adhesion in Waldenström macroglobulinemia. *Haematologica*, 2016, 101(3):e111-5
76. Dhodapkar M, Hoering A, Gertz M, Rivkin S, Szymonifka J, Crowley J et al : Long-term survival in Waldenström macroglobulinemia: 10-year follow-up of Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S9003. *Blood*, 2009, 113(4):793-6
77. Dimopoulos M, Anagnostopoulos A, Kyrsonis M, Zervas M, Tsatalas C, Kokkinis G et al : Primary treatment of Waldenström macroglobulinemia with dexamethasone, rituximab, and cyclophosphamide. *J Clin Oncol*, 2007, 25(22):3344-9
78. Dimopoulos M, Garcia-Sanz R, Gavriatopoulou M, Morel P, Kyrtonis M, 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 Eurpena):Myeloma Network (EMN). *Blood*, 2013, 122(19):3276-82
79. Dimopoulos MA, Kastritis E, Owen RG, Kyle RA, Landgren O, Morra E, et al : Treatment recommendations for patients with Waldenström macroglobulinemia (WM) and related disorders: IWWM-7 consensus. *Blood*, 2014,124(9):1404-11
80. Dimopoulos M, Kastritis E, Ghobrial I: Waldenström's macroglobulinemia: a clinical perspective in the era of novel therapeutics. *Annals of Oncology*, 2016, 27:233-240

81. Ditzel Santos D, Ho AW, Tournilhac O, Hatjiharissi E, Leleu X, Xu L, et al : Establishment of BCWM.1 cell line for Waldenström's macroglobulinemia with productive in vivo engraftment in SCID-hu mice. *Exp. Hematol.* 2007, 35(9):1366-75.
82. Eby CS : Bleeding and Thrombosis Risks in Plasma Cell Dyscrasias: ASH Education Book vol. 2007 no. 1 158-164 (doi: 10.1182/asheducation-2007.1.158)
83. Elsawa SF, Novak AJ, Grote DM, Ziesmer SC, Witzig TE, Kyle RA, et al : B-lymphocyte stimulator (BLyS) stimulates immunoglobulin production and malignant B-cell growth in Waldenström macroglobulinemia. *Blood.* 2006,1, 107(7):2882-8.
84. Elsawa SF, Novak AJ, Ziesmer SC, Almada LL, Hodge LS, Grote DM, et al : Comprehensive analysis of tumor microenvironment cytokines in Waldenström macroglobulinemia identifies CCL5 as a novel modulator of IL-6 activity. *Blood.* 2011,17,118(20):5540-9.
85. Elsawa SF, Ansell SM: Cytokines in the microenvironment of Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009, 9(1):43-5.
86. Esteller M : Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008, 358(11):1148-59.
87. Fonseca R, Braggio E: The MYDas touch of next-gen sequencing. *Blood,* 2013, 121(13):237374
88. Fouquet G, Guidez S, Petillon MO, Louni C, Ohya B, Dib M et al : Lenalidomide is safe and active in Waldenström macroglobulinemia. *Am J Hematol,* 2015, 90(11):1055-9
89. Fouquet G and Poulain S, Schraen S, Koulieris E, Bertrand E, Guidez S et al : Waldenström macroglobulinemia, Section IV, Laboratory investigations and findings: Hematological abnormalities, Biochemical investigations, Free light and heavy chains. Springer, in press
90. Forster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerls C et al : Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR7/fusin on various leukocytes subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *Journal of Immunology,* 1998, 160:1522-31
91. Freitas C, Desnoyer A, Meuris F, Bachelier F, Balabanian K, Machelon V: The relevance of the chemokine receptor ACKR3/CXCR7 on CXCL12-mediated effects in cancers with a focus on virus-related cancers. *Cytokine Growth Factors Reviews,* 2014, 307-316
92. Fulciniti M, Amodio N, Bandi R, Munshi M, Yang G, Xu L, Hunter Z, Tasone P, Anderson K, Treon S, Munshi N: MYD88-independent growth and survival effects of Sp1 transactivation in Waldenström macroglobulinemia. *Blood,* 2014, 123(17): 2673-2681
93. 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
94. Garcia-Sanz R, Montoto S, Torrequebrada A, De Coca A, Petit J, Sureda A et al : Waldenström macroglobulinemia: presenting features and outcome in a series with 217 cases. *Br J Haematol,* 2001, 115(3):575-82
95. Garcia-Sanz R, Ocio E, Caballero A, Magalhaes R, Alonso J, Lopez-Anglada L et al : Post – treatment bone marrow residual disease > 5% by flow cytometry is highly predictive of short progression-free and overall survival in patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk,* 2011, 11(1):168-71

96. Gaudette B, Dwivedi B, Chitta K, Poulain S, Powell D, Vertino P et al : Low expression of proapoptotic Bcl-2 family proteins sets the apoptotic threshold in Waldenström macroglobulinemia. *Oncogene*, 2016, 35(4):479-90
97. Genovese G, Kahler A, Handsaker R, Lindberg J, Rose S, Bakhoum S, et al : Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *New England Journal of Medicine*, 2014, 371:2477-87
98. Ghobrial IM, Gertz MA, Fonseca R: Waldenström macroglobulinemia. *Lancet Oncol*. 2003, 4(11):679-85
99. Ghobrial IM, Uslan DZ, Call TG, Witzig TE, Gertz MA: Initial increase in the cryoglobulin level after rituximab therapy for type II cryoglobulinemia secondary to Waldenström macroglobulinemia does not indicate failure of response. *Am. J. Hematol*. 2004, 77(4):329-30
100. Ghobrial I , Gertz M, Laplant B, Camoriano J, Hayman S, Lacy M, Chuma S et al : Phase II trial of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in relapsed or refractory Waldenström macroglobulinemia. *J Clin Oncol*, 2010, 28(8):1408-14
101. Ghobrial IM, Zhang Y, Liu Y, Ngo H, Azab F, Sacco A, et al : The bone marrow niche in Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011,1;11(1):118-20.
102. Ghobrial I, Moreau P, Harris B, Poon T, Jourdan E, Maisonneuve H, Benhadji K et al : A multicenter phase II study of snigel-agent enzastaurin in previously treated Waldenström macroglobulinemia. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(18):5043-50
103. Ghobrial I, Redd R, Armand P, Banwait R, Boswell E, Chuma S, Huynh D, Sacco A, Roccaro A, Perilla-Glen A, Noonan K, MacNabb M, Leblebjian H, Warren D, Henrick P, Castillo J, Richardson P, Matous J, Weller E, Treon S: Phase I/II trial of everolimus in combination with bortezomib and rituximab (RVR) in relapsed/refractory Waldenström macroglobulinemia. *Leukemia*, 2015, 29(12): 2338-46
104. Gnemmi V, Leleu X, Provot F, Moulonguet F, Buob D: Cast nephropathy and light-chain deposition disease in Waldenström macroglobulinemia. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 2012, 60 (3):487-491.
105. Grass S, Preuss K-D, Wikowicz A, Terpos E, Ziepert M, Nikolaus D, et al : Hyperphosphorylated paratarg-7: a new molecularly defined risk factor for monoclonal gammopathy of undetermined significance of the IgM type and Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2011, 10;117(10):2918-23
106. Greaves P, Gribben J: The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood*, 2013, 121(5):734-744
107. Guinamard R, Signoret N, Ishiai M, Marsh M, Kurosaki T, Ravetch J: B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF1)-1 alpha chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4. *J Exp Med*, 1999, 189(9):1461-6
108. Gulino A, Moratto D, sozzani S, Cavadini P, Otero K, Tassone L et al : Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood*, 2004, 104:444-452

109. Gustine J, Meid K, Xu L, Hunter Z, Castillo JJ, Treon S: To select or not select ? The role of B-cell selection in determining the MYD88 mutation status in Waldenström macroglobulinemia. *British Journal of Haematology*, 2016, in press
110. Gutiérrez NC, Ocio EM, de Las Rivas J, Maiso P, Delgado M, Fermiñán E, et al : Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenström's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia*. 2007, 21(3):541-9
111. Giardano T, Henderson L, Landgren O, Chiao E, Kramer J, El-Serag H, Engels E: Risk of non-Hodgkin lymphoma and lymphoproliferative precursor diseases in US veterans with hepatitis C virus. *JAMA*, 2007, 297(18): 2010-2017
112. Hamadeh F, MacNamara S, Aguilera N, Swerdlow S, Cook J. MYD88L265P mutation analysis helps define nodal lymphoplasmacytic lymphoma. *Modern Pathology*, 2015, 28(4):564-74
113. Hatjiharissi E, Ngo H, Leontovich AA, Leleu X, Timm M, Melhem M, et al : Proteomic analysis of Waldenström macroglobulinemia. *Cancer Res*. 2007, 15;67(8):3777-84
114. Hatzimichael EC, Christou L, Bai M, Kolios G, Kefala L, Bourantas KL: Serum levels of IL-6 and its soluble receptor (sIL-6R) in Waldenström's macroglobulinemia. *Eur. J. Haematol*. 2001, 66(1):1-6
115. Hauer J, Püschner S, Ramakrishnan P, Simon U, Bongers M, Federle C, et al : TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2005, 22;102(8):2874-9
116. Heinrichs S, Li C, Look AT: SNP array analysis in hematologic malignancies: avoiding false discoveries. *Blood*, 2010, 115(21), 4157-61
117. Herbaux C, Bertrand E, Marot G, Roumier C, Poret N, Soenen V, et al : Bach2 promotes indolent clinical presentation in Waldenström macroglobulinemia. *Oncotarget*, 2016, 9917
118. Herman S, Mustafa R, Jones J, Wong D, Farooqui M, Wiestner A: Treatment with ibrutinib inhibits BTK-and VLA4 dependant adhesion of chronic lymphocytic leukemia cells in vivo. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(20):4642-51
119. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, et al : Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nature Genetic*. 2003, 34(1):70-4
120. 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
121. Hivert B, Tamburini J, Vekhoff A, Tournilhac O, Leblond V, Morel P: Prognostic value of the International Scoring System and response in patients with advanced Waldenström macroglobulinemia. *Haematologica*, 2011, 96(5):785-8
122. Ho AW, Hatjiharissi E, Ciccarelli BT, Branagan AR, Hunter ZR, Leleu X, et al : CD27-CD70 interactions in the pathogenesis of Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2008, 112(12):4683-9

123. Hochberg Ba: Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 57. 1995:289–300
124. Hodge LS, Novak AJ, Grote DM, Braggio E, Ketterling RP, Manske MK, et al : Establishment and characterization of a novel Waldenström macroglobulinemia cell line, MWCL-1. *Blood*. 2011, 12;117 (19):e190-197
125. Hodge LS, Elsaywa SF, Grote DM, Price-Troska TL, Asmann YW, Fonseca R, et al : MicroRNA expression in tumor cells from Waldenström's macroglobulinemia reflects both their normal and malignant cell counterparts. *Blood Cancer J*. 2011, 1(6):e24
126. Hodge LS, Ziesmer SC, Yang ZZ, Secreto FJ, Gertz MA, Novak AJ, et al : IL-21 in the bone marrow microenvironment contributes to IgM secretion and proliferation of malignant cells in Waldenström's macroglobulinemia. *Blood*. 2012, 1;120(18):3774-82
127. Hodge L, Ziesmer S, Yang Z, secreto F, Novak A, Ansell S: Constitutive activation of STAT5A and STAT5B regulates IgM secretion in Waldenström's macroglobulinemia. *Blood*, 2014, 123(7):1055-8
128. Hultcrantz M, Pfeiffer RM, Bjorkholm M, Goldin LR, Turesson I, Schulman S, Landgren O, Kristinsson SY: Elevated risk of venous but not arterial thrombosis in Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphoma. *J Thromb Haemost*, 2014,12 (11):1816-1821
129. Hunter ZR, Branagan AR, Manning R, Patterson CJ, Santos DD, Tournilhac O, et al : CD5, CD10, and CD23 expression in Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma*. 2005, 5(4):246-9
130. Hunter ZR, Manning RJ, Hanzis C, Ciccarelli BT, Ioakimidis L, Patterson CJ, et al : IgA and IgG hypogammaglobulinemia in Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica*. 2010, 95(3):470-5.
131. 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;123:1637-46
132. Hunter Z, Xu L, Yang G, Tsakmaklis N, Vos J, Liu X, Chen J, Manning R, Chen J, Broadsky P, Patterson C, Gustine J, Debeau T, Castillo J, Anderson K, Munshi N, Treon S: Next generation sequencing identifies a transcriptional profile that segues with genomic alterations in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, 2016 in press
133. Imashuku S, Miyagawa A, Chiyonobu T *et al* . Epstein-Barr virus-associated T-lymphoproliferative disease with hemophagocytic syndrome, followed by fatal intestinal B lymphoma in a young adult female with WHIM syndrome. Warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis. *Ann Hematol* 2002; 81: 470–473
134. 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 Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica*. 2008, 93(5):793-4
135. Izzo F, Landau D: Genetic and epigenetic determinants of B-cell lymphoma evolution. *Current Opinion hematology*, 2016, 23:392-401

136. Janz S : Waldenström macroglobulinemia : Clinical and Immunological aspects, natural history, cell origin, and emerging mouse models. *ISRN Hematol* 2013, 9, 2013:815325
137. Jeelall YS, Horikawa K: Oncogenic MYD88 mutation drives Toll pathway to lymphoma. *Immunol. Cell Biol.* 2011, 89(6):659-60
138. Jimenez C, Sebastian E, Chillon M, Giraldo P, Mariano Hernandez J, Escalante F, et al : MYD88L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia*, 2013, 27(8), 1722-28
139. Kastritis E, Kyrtsolis M-C, Hadjiharissi E, Symeonidis A, Michalis E, Repoussis P, et al : Validation of the International Prognostic Scoring System (IPSS) for Waldenström's macroglobulinemia (WM) and the importance of serum lactate dehydrogenase (LDH). *Leuk. Res.* 2010, 34(10):1340-3
140. Kastritis E, Kyrtsolis M, Morel P, Gavriatopoulou M, Hatjiharissi E, Symeonidis A, et al : Competing risk survival analysis in patients with symptomatic Waldenström macroglobulinemia: the impact of disease unrelated mortality and rituximab-based primary therapy. *Haematologica*, 2015, 100(11):e446-9
141. King R, Gonsalves W, Ansell S, Greipp P, Frederick L, Viswanatha D, et al : Lymphoplasmacytic lymphoma with a non IgM paraprotein shows clinical and pathologic heterogeneity and may harbor MYD88L265P mutations. *American Journal of Clinical pathology*, 2016, 145(6):843-51
142. Kim SY, Volsky DJ. PAGE: parametric analysis of gene set enrichment. *BMC Bioinformatics*. 2005;6:144
143. Kirshner J, Thulien K, Kriangkum J, Motz S, Belch A, Pilarski M: In a patient with biclonal Waldenström macroglobulinemia only one clone expands in three-dimensional culture and includes putative cancer stem cells. *Leuk Lymphoma*, 2011, 52(2):285-9
144. Klein U, Casola S, Cattoretti G, Shen Q, Lia M, Mo T, et al : Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 2006;7(7):773-82
145. Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, et al : B cell specific constitutional expression of MYD88p252P leads to the development of diffuse large B cell lymphoma in mice. *Blood*, 2016, 127(22):2732-41
146. Konoplev S, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE, Jorgensen JL, Lin P: Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 2005, 124(3):414-20.
147. Koshiol J, Gridley G, Engels E et al :Mc Master ML, Landgren O: Chronic immune stimulation and subsequent Waldenström macroglobulinemia. *Arc Intern Med*, 2008, 168(17):1903-1909
148. Kosho T, Okamoto N: *Coffin-Siris Syndrome International Collaborators* - Genotype-phenotype correlation of Coffin-Siris syndrome caused by mutations in SMARCB1, SMARCA4, SMARCE1, and ARID1A - *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2014, 166C(3):262-75
149. Kraan W, Horlings H, van Keimpema M, Schilder-Tol E, Oud M, Scheepstra C et al : High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer Journal*, 2013, e3139

150. Kriangkum J, Taylor B, Treon S, Mant M, Belch A, Pilarski L: Clonotypic IgM V/D/J sequence analysis in Waldenström macroglobulinemia suggests an unusual B-cell origin and an expansion of polyclonal B cells in peripheral blood. *Blood*, 2004, 104(7): 2134-42
151. Kriangkum J, Taylor BJ, Strachan E, Mant MJ, Reiman T, Belch AR, et al : Impaired class switch recombination (CSR) in Waldenström macroglobulinemia (WM) despite apparently normal CSR machinery. *Blood*. 2006, 107(7):2920-7
152. Kriangkum J, Taylor B, Treon S, Mant M, Reiman T, Belch A, Pilarski L: Molecular characterization of Waldenström's macroglobulinemia reveals frequent occurrence of two B-cell clones having distinct IgH VDJ sequences. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13: 2005-13
153. Kristinsson SY, Koshiol J, Björkholm M, Goldin LR, McMaster ML, Turesson I, et al : Immune-related and inflammatory conditions and risk of lymphoplasmacytic lymphoma or Waldenström macroglobulinemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 2010, 21,102(8):557-67
154. Kristinsson SY, Björkholm 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, 15, 112(8):3052-6
155. Kyrtsenis M-C, Levidou G, Korkolopoulou P, Koulteris E, Bartzi V, Maltezas D, et al : CD138 expression helps distinguishing Waldenström's macroglobulinemia (WM) from splenic marginal zone lymphoma (SMZL). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011, 11(1):99-102
156. Kyle RA, Benson JT, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, et al : Progression in smoldering Waldenström macroglobulinemia: long-term results. *Blood*. 2012, 10, 119(19):4462-6
157. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al : A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N. Engl. J. Med.* 2002, 21;346(8):564-9
158. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Remstein ED, Offord JR, Larson DR, et al : Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2003, 15;102(10):3759-64
159. 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
160. Kuitse I, Baladandayuthapani V, Lin H, Thomas S, Bjorklund C, Weber D, Wang M, Shah J, Zhang X, Jones R, Ansell S, Yang G, Treon S, Orlowski R: Targeting the spleen tyrosine kinase with fostamatinib as a strategy against Waldenström Macroglobulinemia. *Clinical Cancer Research*, 2015, 21(11): 2538-45
161. Landau D, Carter S, Stojanov P, Mc Kenna A, Stevenson K, Lawrence M et al : Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 2013, 152(4):714-26
- 161B. Landau D, Carter S, Getz G, Wu C: Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia*, 2014, 28(1): 34-43

162. Landgren O, Staudt L: MYD88 L265P somatic mutation in IgM MGUS. *N Engl J Med* 2012; 367: 2255- 2256.
163. Lagane B, Chow K, Balabanian K, Levoye A, Harriague J, Planchenault T et al : CXCR4 dimerisation and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood*, 2008, 112(1):34-44
164. Lee Y, Noh T, Lee M, Jameson J, Lee E: Absence of activating mutations of CXCR4 in pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010, 72(2):209-13
165. Leblond V, Johnson S, Chevret S, Copplesstone A, Rule S, Tournilhac O, et al : Results of a randomized trial of chlorambucil versus fludarabine for patients with untreated Waldenström macroglobulinemia, marginal zone lymphoma, or lymphoplasmacytic lymphoma. *J Clin Oncol*, 2013, 31(3): 301-7
- 165B. Leblond V, Kastiris E, Advani R, Ansell S, Buske C, Castillo J, et al.: Treatment recommendations for Waldenström macroglobulinemia from the Eighth International Workshop on WM. *Blood*, 2016. DOI.1182/blood-2016-711234
166. Le Garff- Tavernier M, Herbi L, De Romeuf C, Azar N, Ross-Weil D, Bonnemye P, et al : The optimized anti CD20 monoclonal antibody ublituximab bypasses natural killer phenotypic features in Waldenström macroglobulinemia. *Haematologica*, 2015, 100(4): e147-51
167. Leleu X, O'Connor K, Ho AW, Santos DD, Manning R, Xu L, et al : Hepatitis C viral infection is not associated with Waldenström's macroglobulinemia. *Am. J. Hematol.* 2007, 82(1):83-4
168. Leleu X, Jia X, Runnels J, Ngo HT, Moreau A-S, Farag M, et al : The Akt pathway regulates survival and homing in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2007, 110(13):4417-26
169. 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 Waldenström macroglobulinemia. *Leuk. Lymphoma*. 2008, 49(6):1104-7
170. Leleu X, Eeckhoutte J, Jia X, Roccaro AM, Moreau A-S, Farag M, et al : Targeting NF-kappaB in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2008, 15,111(10):5068-7.
171. Leleu X, Hunter ZR, Xu L, Roccaro AM, Moreau A-S, Santos DD, et al : Expression of regulatory genes for lymphoplasmacytic cell differentiation in Waldenström Macroglobulinemia. *Br. J. Haematol.* 2009, 145(1):59-63
172. Leleu X, Soumerai J, Roccaro A, Hatjiharissi E, Hunter Z, 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
173. Leleu X, Xie W, Bagshaw M, Banwait R, Leduc R, Roper N et al : The role of serum immunoglobulin free light chain in response and progression in Waldenström macroglobulinemia. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9):3013-8
174. Levy Y, Ferman JP, Navarro S, Schmitt C, Vainchenker W, Seligmann M, et al : Interleukin 6 dependence of spontaneous in vitro differentiation of B cells from patients with IgM gammopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990, 87(9):3309-13
175. Lenz G, Davis R, Ngo V, Lam L, George T, Wright G et al : Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*, 2008, 319(5870): 1676-9

176. Li J, Sze D, Brown R, Cowley M, Kaplan W, Mo S et al : Clonal expansion of cytotoxic T cells exist in the blood of patients with Waldenström macroglobulinemia but exhibit anergic properties and are eliminated by nucleoside analogue therapy. *Blood*, 2010, 115(7): 3580-8
- 176B. Liu T, Li X, You S, Bhuyan S, Dong L: Effectiveness of AMD3100 in treatment of leukemia and solid tumors: from original discovery to use in current clinical practice. *Exp. Hematol Oncol*, 2016, 5:19
177. Liu Q, Chen H, Ojode T, Gao X, Anaya-O'Brien S, Turner N et al : WHIM syndrome caused by a single amino acid substitution in the carboxy-tail of chemokine receptor CXCR4. *Blood*, 2012, 120(1):181-189
178. Liu Q, Pan C, Lopez L, Gao J, Velez D, Anaya-O'Brien S et al : WHIM syndrome caused by Waldenström's macroglobulinemia-associated mutation CXCR4 (L329fs). *J Clin Immunol*, 2016, 36(4): 397-405
179. Liu X, Hunter Z, Xu L, Chen J, Tsakmaklis N, Patterson C, Castillo J, Burrage S, Gray N, Treon S, Yang G: Targeting Myddosome assembly in Waldenström macroglobulinemia. *British Journal of Haematology*, 2016, in press
180. Lin P, Bueso-Ramos C, Wilson C, Mansoor A, Medeiros L: Waldenström macroglobulinemia involving extramedullary sites: morphologic and immunophenotypic findings in 44 patients. *Am J Surg Pathol*, 2003, 27 (8): 1104-13
181. Lin P, Hao S, Handy BC, Bueso-Ramos CE, Medeiros LJ: Lymphoid neoplasms associated with IgM paraprotein: a study of 382 patients. *American Journal of Clinical Pathology*, 2005, 123 (2):200-205
182. Lim KH, Yang Y, Staudt LM : Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF-kappaB in lymphoid malignancies. *Immunol Rev*. 2012, 246(1):359-78.
183. Lohr J, Stojnov P, Lawrence M, Auclair D, Chapuy B, Sougne C, et al : Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole –exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(10)38
184. Loianno M, Ruggiero V, Sette C: Targeting the Toll-like receptor/interleukin 1 receptor pathway in human diseases: rational design of MyD88 inhibitors. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 2013, 13, 222-6
185. Loianno M, Volpe E, Ruggiero V, Gallo G, Furlan R, Maiorino C, et al : Mutational analysis identifies residues crucial for homodimerization of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and for its function in immune cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(42):30210-30222
186. Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, Ferrarini M, Chiorazzi N: CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood*. 2011, 29, 118(13):3470-.
187. Majid A, Lin TT, Best G, Fishlock K, Hewamana S, Pratt G, et al : CD49d is an independent prognostic marker that is associated with CXCR4 expression in CLL. *Leuk. Res*. 2011, 35(6):750-6
188. Mateos MV, Garcia-Sanz R, López-Pérez R, Balanzategui A, González MI, Fernández-Calvo J, et al : p16/INK4a gene inactivation by hypermethylation is associated with aggressive variants of monoclonal gammopathies. *Hematol. J*. 2001, 2(3):146-9

- 189.** Marchese A: Endocytic trafficking of chemokine receptors: *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 27:72-7
- 190.** Marot G, Foulley J-L, Mayer C-D, Jaffrézic F: Moderated effect size and P-value combinations for microarray meta-analyses. *Bioinformatics*. 2009, 15;25(20):2692-9
- 191.** Martinez N, Almaraz C, Vaque JP, Varela I, Derdak S, Beltran S, et al : Whole-exome sequencing in splenic marginal zone lymphoma reveals mutations in genes involved in marginal zone differentiation. *Leukemia*. 2014, 28(6):1334-40
- 192.** Martín-Jiménez P, García-Sanz R, Balanzategui A, Alcoceba M, Ocio E, Sanchez ML, et al : Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenström's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica*. 2007, 92(5):635-42
- 193.** Martín-Jiménez P, García-Sanz R, Sarasquete ME, Ocio E, Pérez JJ, González M, et al : Functional class switch recombination may occur «in vivo» in Waldenström macroglobulinaemia. *Br. J. Haematol*. 2007, 136(1):114-6
- 194.** Martinez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A, Aymerich M, Jares P, Jaun M, et al : Mutation in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood*, 2014, 123(24):3790-6
- 195.** Mayeur-Rousse C, Guy J, Miguet L, Bouyer S, Genevieve F, Robillard N, et al : CD180 expression in B-cell lymphomas: a multicenter GEIL study. *Cytometry B Clin Cytometry*, 2015, doi: 10.1002/cyto.b.21325
- 195B.** Mason C, Savona S, Rini J, Castillo J, Xu L, Hunter Z, et al: Ibrutinib penetrates the blood brain barrier and shows efficacy in the therapy of Bing Neel syndrome. *Br. J. Haematol*. 2016, DOI:10.1111/bjh.14218
- 196.** McDermott D, Liu Q, velez D, Lopez L, Anaya-O'Brien S, Ulrick J et al : A phase 1 clinical trial of long-term, low-dose treatment of WHIM syndrome with the CXCR4 antagonist plerixafor. *Blood*, 2014, 123(15): 2308-16
- 197.** McDermott D, Gao JL, Liu Q, Siwicki M, Martens C, Jacobs P et al : Chromothriptic cure of WHIM syndrome. *Cell*, 2015, 160(4):686-699
- 198.** McGinn OJ, English WR, Roberts S, Ager A, Newham P, Murphy G: Modulation of integrin $\alpha 4 \beta 1$ by ADAM28 promotes lymphocyte adhesion and transendothelial migration. *Cell Biol. Int*. 2011 , 35(10):1043-53
- 199.** Mc Guire P, Cunningham-Rundles C, Ochs H, Diaz G: Oligoclonality, impaired class switch and B-cell memory responses in WHIM syndrome. *Clin Immunol*, 2010, 135(3):412-21
- 200.** 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
- 201.** Morra E, Cesana C, Klersy C, Barbarano L, Varettoni M, Cavanna L, et al : Clinical characteristics and factors predicting evolution of asymptomatic IgM monoclonal gammopathies and IgM-related disorders. *Leukemia*. 2004, 18(9):1512-7

202. Moreau AS, Jia X, Ngo H, Leleu X, O'Sullivan G, Alsayed Y, et al : Protein kinase C inhibitor enzastaurin induces in vitro and in vivo antitumor activity in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, 2007, 109: 4964-4972
203. Moreau AS, Sebti Y, Duhamel A, Roccaro A, Coiteux V, Gastinne T et al : Clinical relevance of soluble HLA class I molecules in Waldenström macroglobulinemia. *Eur J Haematol*, 2008, 80(6): 503-9
204. Morel P, Monconduit M, Jacomy D, Lenain P, Grosbois B, Bateli C, et al : patients with the description of a new scoring system and its validation on 253 other patients. *Blood*. 2000, 1, 96(3):852-8
205. Morel P, Duhamel A, Gobbi P, Dimopoulos MA, Dhodapkar MV, McCoy J, et al : International prognostic scoring system for Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2009, 113(18):4163-70
206. Morel P, Merlini G. Risk stratification in Waldenström macroglobulinemia: *Expert Rev Hematol*. 2012, 5(2):187-99
207. Morice WG, Chen D, Kurtin PJ, Hanson CA, McPhail ED: Novel immunophenotypic features of marrow lymphoplasmacytic lymphoma and correlation with Waldenström's macroglobulinemia. *Mod. Pathol*. 2009, 22(6):807-16
208. Morra E, Varettoni M, Tedeschi A, Arcaini L, Ricci F, Pascutto C, et al : Clue for common genetic predisposition. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.*, 2013, 13(6):700-3
209. Munk R, Ghosh P, Ghosh M, Saito T, Xu M, Carter A et al : Involvement of mTOR in CXCL12 mediated T cell signaling and migration. *PlosOne*, 2011, e24667
210. Musilova K, Mraz M: MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia*, 2015, 29(5):1004-17
211. Muz B, De La Puente P, Azab F, Ghobrial I, Azab A: Hypoxia promotes dissemination and colonisation in next bone marrow niches in Waldenström Macroglobulinemia. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(2):263-72
212. Nagao T, Oshikawa G, Ishida S, Akiyama H, Umezawa Y, Nogami A, Kurosu T, Miura O: A novel MYD88 mutation , L265RPP, in Waldenström macroglobulinemia activates the NFκB pathway to upregulated Bcl-xL expression and enhance cell survival. *Blood Cancer Journal*, 2015, 5,e314
213. Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Jizasa H, Bleul C, Yoshie O et al : Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell-growth-stimulating factor/ stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *PNAS*, 1996, 93, 25: 14726-14729
214. Netea M, Wijmenga C, O'Neill L : Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol*, 2012; 13(6):535-42
215. 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.
216. Ngo H, Azab A, Farag M, Jia X, Melhem M, Runnels J, et al : Src tyrosine kinase regulates adhesion and chemotaxis in Waldenström macroglobulinemia. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(19):6035-41

217. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al : Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011, 3, 470(7332):115-9
218. Nguyen-Khac F, Lambert J, Chapiro E, Grellet 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*, 2013, 98(4): 649-54
219. Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR, Zou YR: The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med*. 2004 Nov 1;200(9):1145-56
220. Ocio EM, Hernandez JM, Mateo G, Sanchez ML, Gonzalez B, Vidriales B, et al : Immunophenotypic and cytogenetic comparison of Waldenström's macroglobulinemia with splenic marginal zone lymphoma. *Clin Lymphoma*. 2005, 5(4):241-5
221. Ocio EM, Schop RFJ, Gonzalez B, Van Wier SA, Hernandez-Rivas JM, Gutierrez NC, et al : 6q deletion in Waldenström macroglobulinemia is associated with features of adverse prognosis. *Br. J. Haematol*. 2007, 136(1):80-6
222. Olteanu H, Harrington A, Kroft S: CD200 expression in plasma cells of nonmyeloma immunoproliferative disorders: clinicopathologic features and comparison with plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol*, 2012, 138(6): 867-76
223. Oike T, Ogiwara H, Nakano T, Yokota J, Kohno T: Inactivating mutations in SWI-SNF chromatin remodeling genes in human cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 2013, 43 (9): 849-855
224. O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP: Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood*, 2010, 115(14), 2731-9
225. 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
226. Owen RG, Pratt G, Auer RL, Flatley R, Kyriakou C, Lunn MP, et al : Guidelines on the diagnosis and management of Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol*, 2014, 165 (3):316-333
227. Owen R, Kyle R, Stone M, Rawstron A, Leblond V, Merlini G, et al : Response assessment in Waldenström macroglobulinemia: update from the Vith International Workshop on Waldenström macroglobulinemia. *British Journal of Haematology*, 2013, 160(2):171-6
228. Pangalis GA, Kyrtsolis M-C, Kontopidou FN, Siakantaris MP, Dimopoulos MN, Vassilakopoulos TP, et al : Differential diagnosis of Waldenström's macroglobulinemia and other B-cell disorders. *Clin Lymphoma*. 2005, 5(4):235-40.
229. Parry M, Rose-Zerilli M, Ljungstrom V, Gibson J, Wang J, Walewska R et al : Genetics and prognostication in plenic marginal zone lymphoma: revelations from deep sequencing. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(18): 4174-83
230. Paiva B, Montes M, Garcia-Sanz R, Ocio E, 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

231. Paiva B, Corchete L, Vidriales M, Garcia-Sanz R, Perez J, Aires-Mejia I et al : The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, 2015, 125(15):2370-80
232. Pepper C, Buggins A, Jones C, Walsby E, Forconi F, Pratt G et al : Phenotypic heterogeneity in IGHV-mutated CLL patients has prognostic impact and identifies a subset with increased sensitivity to BTK and PI3K δ inhibition. *Leukemia*, 2015, 739-757
233. Perrot A, Pionneau C, Azar N, Baillou C, Lemoine FM, Leblond V, et al : Waldenström's macroglobulinemia harbors a unique proteome where Ku70 is severely underexpressed as compared with other B-lymphoproliferative disorders. *Blood Cancer J*. 2012;2:e88
234. Petit B, Chaury MP, Le Clorennec C, Jaccard A, Gachard N, Moalic-Judge S, Labrousse F, Cogné M, Bordessoule D, Feuillard J: Indolent lymphoplasmacytic and marginal zone B-cell lymphoma : absence of both IRF4 and Ki67 expression identifies a better prognosis subgroup. *Haematologica*, 2005, 920:200-2006
235. Petrikos L, Kyrtsos MC, Roumelioti M, Georgiou G, Efthymiou A, Tzenou T, Panayiotidis P: Clonotypic analysis of immunoglobulin heavy chain sequences in patients with Waldenström's macroglobulinemia: correlation with MYD88L265P somatic status, clinical features, and outcome. *Biomed research International*, 2014:809103
236. Picard C, Casanova JL, Puel A: Infectious diseases in patients with IRAK-4, MYD88, NEMO, or I κ B α deficiency. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, 490-497
237. Pillai V, Pozdnyakova O, Charest K, Li B, Shahsafaei A, Dorfman D: CD200 flow cytometric assessment and semiquantitative immunohistochemical staining distinguishes hairy cell leukemia from hairy cell leukemia-variant and other B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*, 2013, 140(4):536-43
238. Piva R, deaglio S, Fama R, Buonincontri R, Scarfo I, Bruscaggin A et al : The Kruppel-like factor 2 transcription factor gene is recurrently mutated in splenic marginal zone lymphoma. *Leukemia*, 2015, 29(2):503-7
239. Pizzi M, Boi M, Bertoni F, Inghirami G: Emerging therapies provide new opportunities to reshape the multifaceted interactions between the immune system and lymphoma cells. *Leukemia*, 2016, 1-11.DOI:10.1038/leu.2016.161
240. Ponader S, Burger J: Bruton's tyrosine kinase: from X-linked agammaglobulinemia toward targeted therapy for B-cell malignancies. *J Clin Oncol*, 2014,10,32(17):1830-9
- 240B. Popp M, Maquat L: Leveraging rules of nonsense-mediated mRNA decay for genome engineering and personalized medicine. *Cell*, 2016, 2; 165(6):1319-22
241. Poulain S, Dervite I, Leleu X, Fernandes J, Stalnikiewicz L, Moreau A-S, et al : Autoimmune hemolytic anemias and IgG antierythrocyte autoantibodies in Waldenström's macroglobulinemia: association with Fc γ RIIIa polymorphism. *Leukemia*. 2006,20(6) :1179-81.
242. Poulain S, Dervite I, Leleu X, Coiteux V, Duthilleul P, Morel P: The IL6(-174G/C) polymorphism is a prognostic factor for survival after treatment initiation in Waldenström macroglobulinemia patients aged 65 years or less. *Haematologica*, 2008, 93(7):1109-11

243. Poulain S, Ertault M, Leleu X, Coiteux V, Fernandes J, Stalnikiewicz L : SDF1/CXCL12 (-801GA) polymorphism is a prognostic factor after treatment initiation in Waldenström Macroglobulinemia. *Leuk Res*, 2009, 33(9):1204-7
244. Poulain S, Aijjou R, Broucqsaule N, Manier S, Galiégue-Zouitina S, Herbaux C, et al : SOCS1 and SOCS3 Genes Are Not Methylated In Waldenström Macroglobulinemia. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2010;(Abstract 2481)
245. Poulain S, Wemeau M, Balkaran S, Hivert B, Hauteceur A, Rossignol J, et al : Macroglobulinémie de Waldenström. *La Revue de médecine interne*. 2010;31:385-94
246. Poulain S, Roumier C, Decambron A, Renneville A, Herbaux C, Bertrand E, *et al* : MYD88 L265P mutation in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2013;121:4504-11
247. Poulain S, Herbaux C, Bertrand E, Decambron A, Fouquet G, Boyle G, Boyle E, Gay J, Manier S, Duthilleul P, Roumier C, Leleu X: Genomic studies have identified multiple mechanisms of genetic changes in Waldenström macroglobulinemia. *Clinical Lymphoma Myeloma leukemia*, 2013, 13(2):202-4
248. Poulain S, Roumier C, Galiegue-Zouitina S, Daudignon A, Herbaux C, Aijjou R, et al : Genome wide SNP array identified multiple mechanisms of genetic changes in Waldenström macroglobulinemia. *Am J Hematol*. 2013, 88(11):948-54
249. 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.
250. Poulain S, Boyle E, Tricot S, Demarquette H, Doye E, Roumier C et al : Absence de CXCR4 mutations but high incidence of double mutant in CD79A/B and MYD88 in primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol*, 2015, 170(2): 285-7
251. Puente X, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez G, Villamor N et al : Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 2011, 475(7354):101-5
252. Quintas-Cardama A, Verstovsek S: Molecular pathways: JAK/STAT pathway: mutations, inhibitors, and resistance. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(8): 1933-40
253. Randen U, Troen G, Tierens A, Steen C, Warsame A, Beiske K, et al : Primary cold agglutinin-associated lymphoproliferative disease: a B-cell lymphoma of the bone marrow distinct from lymphoplasmacytic lymphoma. *Haematologica*, 2014, 99(3):497-504
254. Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW: Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. 2010, 2010(6):pdb.prot5439.
255. 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*, 2015, 29(2), 337-45
256. Roccaro AM, Sacco A, Chen C, Runnels J, Leleu X, Azab F, et al : microRNA expression in the biology, prognosis, and therapy of Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2009, 30;113(18):4391-402.

257. Roccaro A, Sacco A, Jia X, Azab A, Maiso P, Ngo H et al : Micro RNA –dependant modulation of histone acetylation in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, 2010, 116(9):1506-14
258. Roccaro A, Sacco A, Husu E, Pitsillides C, Vesole S, Azab A et al : Dual targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway as an antitumor strategy in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, 2010, 115(3):559-69
259. Roccaro A, Sacco A, Jia X, Banwait R, Maiso P, Azab F et al : Mechanisms of activity of the TORC1 inhibitor everolimus in Waldenström macroglobulinemia. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(24):6609-22
260. 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, 26;123(26):4120-31
261. Roccaro A, Sacco A, Shi J, Chiarini M, Perilla-Glen A, Manier S et al : Exome sequencing reveals recurrent germ line variants in patients with familial Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, 2016, 127(21): 2598-606
262. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, Bruscaggin A, Rasi S, Spina V, et al : The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med*. 2012, 27, 209(9):1537-51.
- 262 Bis. Ruminy P, Etancelin P, Couronne L, Parmentier F, Rainville V, Mareschal S et al : The isotype of the BCR as a surrogate for the GCB and ABC molecular subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 2011, 25(4):681-8
263. Rummel M, Niederle N, Maschmeyer G, Banat G, von Grunhagen U, Losem C, et al : Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicenter, randomized, phase 3 non inferiority trial. *Lancet*, 2013, 381(9873):1203-10
264. Sacco A, Issa GC, Zhang Y, Liu Y, Maiso P, Ghobrial IM, et al : Epigenetic modifications as key regulators of Waldenström’s Macroglobulinemia biology. *J Hematol Oncol*. 2010;3:38.
265. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, et al : TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol*. 2006, 411:134-93.
266. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et al : TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*. 2003, 34(2):374-8.
267. Sahota SS, Forconi F, Ottensmeier CH, Provan D, Oscier DG, Hamblin TJ, et al : Typical Waldenström macroglobulinemia is derived from a B-cell arrested after cessation of somatic mutation but prior to isotype switch events. *Blood*. 2002, 15, 100(4):1505-7.
268. Sahota SS, Babbage G, Weston-Bell NJ: CD27 in defining memory B-cell origins in Waldenström’s macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009, 9(1):33-5.
269. San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E, Mateo G, Sánchez-Guijo F, Sánchez ML, et al : Immunophenotypic analysis of Waldenström’s macroglobulinemia. *Semin. Oncol*. 2003, 30(2):187-95.
270. Santos D, Hatjiharissi E, Tournilhac O, Chemaly M, Leleu X, Patterson C, et al : CD52 is expressed on human mast cells and is a potential therapeutic target in

- Waldenström'macroglobulinemia and mast cell disorders. *Clin Lymphoma Myeloma*, 2006, 6(6):478-83
271. Scala S: Molecular pathways: targeting the CXCR4-CXCL12 axis-untapped potential in the tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research*, 21(19): 4278-4285
 272. Schop RFJ, Kuehl WM, Van Wier SA, Ahmann GJ, Price-Troska T, Bailey RJ, et al : Waldenström macroglobulinemia neoplastic cells lack immunoglobulin heavy chain locus translocations but have frequent 6q deletions. *Blood*. 2002, 100(8):2996-3001.
 273. Schop R, Jalal S, Van Wier S, Ahmann G, Price-Troska T, Kyle R 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
 274. Schop R, VAN Wier S, Xu R, Ghobrial I, Ahmann G, Greipp P et al : 6q deletion discriminates Waldenström macroglobulinemia from IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006, 169(2): 150-3
 275. Schmidt J, Federmann B, Schindler N, et al : MYD88 L265P and CXCR4 mutations in lymphoplasmacytic lymphoma identify cases with high disease activity. *Br J Haematol*. 2015;169(6):795-803.
 276. Schuster S, Rajkumar S, Dispenzieri A, Morice W, Aspitia A, Ansell S, Kyle R, Mikhael J: IgM multiple myeloma: disease definition, prognosis, and differentiation from Waldenström's macroglobulinemia. *Am J of Haematology*, 2010, 85 (11): 853-5
 277. Seda V, Mraz M: B-cell receptor signaling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol*, 2015, 94(3):193-205
 278. 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
 279. Singh A, Eckardt KU, Zimmermann A, Gotz KH, Hamann M, Ratcliffe PJ, Kurtz A, Reinhardt WH : Increased plasma viscosity as a reason for inappropriate erythropoietin formation. *The Journal of clinical investigation*, 1993, 91 (1):251-256.
 280. 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.
 281. Schop RFJ, Van Wier SA, Xu R, Ghobrial I, Ahmann GJ, Greipp PR, et al : 6q deletion discriminates Waldenström macroglobulinemia from IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Cancer Genet. Cytogenet*. 2006, 169(2):150-3.
 282. Smogorzewska A, Flood JG, Long WH, Dighe AS: Paraprotein interference in automated chemistry analyzers. *Clinical chemistry*, 2004, 50 (9):1691-1693.
 283. Spina V, Khiabani H, Messina M, Monti S, Cascione L, Bruscaggin A, et al : The genetics of nodal marginal zone lymphoma. *Blood*, 2016, in press
 284. Stone MJ, Pascual V: Pathophysiology of Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica*, 2010, 95(3):359-64.

285. Stone MJ. Waldenström's macroglobulinemia: Hyperviscosity syndrome and cryoglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009, 9(1):97-9.
286. Swerdlow S, Campo E, Pileri S, Harris N, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles S, Zelenetz, Jaffe E: The 2016 revision of the World Health organisation (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 2016, 27(20):2375-2390
287. Tangye S, Good K: Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or "memory" B cells?. *J Immunol*, 2007, 179(1):13-9
288. Taniuchi S, Masuda M, Fujii Y, Izawa K, Kanegane H, Kobayashi Y: The role of a mutation of the CXCR4 gene in WHIM syndrome. *Haematologica*. 2005;90(9):1271-2.
289. Tarasova N, Stauber R, Michejda C: Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXCR4 chemokine receptor 4. *J Biol Chem*, 1998, 273(26):15883-6
290. Teng YH, Aquino RS, Park PW. Molecular functions of syndecan-1 in disease: *Matrix Biol*. 2012, 31(1):3-16
291. Terpos E, Anagnostopoulos A, Kastritis E, Bamias A, Tsionos K, Dimopoulos M-A : Abnormal bone remodelling and increased levels of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) in Waldenström macroglobulinaemia. *Br. J. Haematol* ,133(3):301-4.
292. Terré C, Nguyen-Khac F, Barin C, Mozziconacci MJ, Eclache V, Léonard C, et al : Trisomy 4, a new chromosomal abnormality in Waldenström's macroglobulinemia: a study of 39 cases. *Leukemia*, 2006, 20(9):1634-6.
293. Traverse Ghehen A, Bachy E, Baseggio L, Callet Bauchu E, et al :Immunoarchitectural patterns in plenic marginal zone lymphoma: correlations with chromosomal aberrations, IgVH mutations, and survival. *A study of 76 cases: Histopathology*, 2013, 62 (6): 876-93
294. Tedeschi A, Picardi P, Ferrero S, Benevolo G, Margiotta Casaluci G, et al : Bendamustine and rituximab combination is safe and effective as salvage regimen in Waldenström macroglobulinemia. *Leukemia Lymphoma*, 2015, 56(9):2637-42
295. Tournilhac O, Santos DD, Xu L, Kutok J, Tai Y-T, Le Gouill S, et al : Mast cells in Waldenström's macroglobulinemia support lymphoplasmacytic cell growth through CD154/CD40 signaling. *Ann. Oncol*. 2006,17(8):1275-82
296. Treon S, Hunter Z, Aggarwal A, Ewen E, Masota S, Lee C, Santos D et al : Characterization of familial Waldenström's macroglobulinemia. *Ann Oncol*, 2006, 17(3):488-94
297. Treon S, Ioakimidis L, Soumerai J, Patterson C, Sheehy P, Nelson M, et al : Primary therapy of Waldenström macroglobulinemia with Bortezomib, dexamethasone, and rituximab: WMCTG clinical Trial 05-180. *Journal of clinical Oncology*, 2009, 27: 3830-35
298. Treon S, Yang G, Hanzis C, Ioakimidis L, Verselis S, Fox E, et al : Attainment of complete/very good partial response following rituximab-based therapy is an important determinant to progression-free survival, and is impacted by polymorphisms in FCGR3A in Waldenström macroglobulinemia. *Br J Haematol*, 2011, 154(2): 223-8
299. 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*. 2012, 30, 367(9):826-33.

- 300.** 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 Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2014, 1;123(18):2791-6.
- 301.** Treon S, Tripsas C, Meid K, Kanan S, Sheehy P, Chuma S et al : Carfilzomib, rituximab, and dexamethasone (CaRD) treatment offers a neuropathy-sparing approach for treating Waldenström's macroglobulinemia. *Blood*, 2014, 124(4):503-10
- 301B.** Treon S, Tripsas C, 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
- 302.** Treon S, Xu L, Hunter Z: MYD88 mutations and response to ibrutinib in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med*, 2015, 373(6):584-6
- 303.** Treon S: How I treat Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, 2015, 126(6):721-732
- 304.** Trojani A, Greco A, Tedeschi A, et al : Microarray demonstrates different gene expression profiling signatures between Waldenström macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013;13(2):208-210.
- 305.** 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
- 305B.** Varettoni M, Zibellini S, Arcaini L, Boveri E, Rattotti S, Pascutto C et al : MYD88(L265P) mutation is an independent risk factor for progression in patients with IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 2013, 122(13):2284-4
- 306.** Varenotti M, Zibellini S, Capello D, Arcaini L, Rossi D, Pascutto C, et al : Clues to pathogenesis of Waldenström macroglobulinemia and immunoglobulin M monoclonal gammopathy of undetermined significance provided by analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement and clustering of B-cell receptors. *Leukemia lymphoma*, 2013, 54(11):2485-9
- 307.** Varettoni M, Arcaini L, Rattotti S, Ferretti V, Cazzola M : Bone marrow assessment in asymptomatic immunoglobulin M monoclonal gammopathies. *British Journal of Haematology*, 2015,168(2):301-2
- 308.** Varettoni M, Tedeschi A, Arcaini L, Pascutto C, Vismara E, Orlandi E, et al : Risk of second cancers in Waldenström macroglobulinemia. *Ann. Oncol.* 2012, 23(2):411-5.
- 309.** Vereecke L, Beyaert R, van Loo G: The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol.* 2009, 30(8):383-91.
- 310.** Von Bernuth H, Picard C, Puel A, Casanova JL: Experimental and natural infections in MYD88 and IRAK4-deficient mice and humans. *Eur J Immunol* 2012; 42(12):3126-35
- 311.** Von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku C, et al : Pyogenic bacterial infections in humans with MYD88 deficiency. *Science*, 2008, 321(5889): 691-696
- 311B.** Vos J, Gustine J, Rennke H, Hunter Z, Manning R, Dubeau T, Meid K, Minnema M, Kersten MJ, Treon S, Castillo J. Renal disease related to Waldenström macroglobulinemia: incidence, pathology and clinical outcomes. *British Journal of Haematology*, 2016, DOI:10.1111/bjh.14279

312. Waldenström J: Incipient myelomatosis or "essential" hyperglobulinemia with fibrinogenopenia — a new syndrome? *Acta Medica Scandinavica*. 1944;117:216-47
313. Walker B, Boyle E, Wardell C, Murison A, Begum D, Dahir N et al : Mutational spectrum, copy number changes and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol*, 2015, 33(33): 3911-20
314. Wang JQ, Jeelall YS, Beutler B, Horikawa K, Goodnow CC: Consequences of the recurrent MYD88(L265P) somatic mutation for B cell tolerance. *J Exp Med*. 2014 Mar 10;211(3):413-26
- 314B. Warnatz K, Schlesier M: Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry Part B (Clinical cytometry)*, 2008, 74B: 261-271
315. Warner N, Nunez G: MYD88 : a critical adaptor in innate immunity signal transduction. *J Immunol*, 2013, 190(1):3-4
316. Wegner S. A., Ehrenberg P, Chang G, Dayhoff D, Sleeker AL, Michael N: 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: 4754-4760
317. Willenbacher W, Willenbacher E, Brunner A, Manzl C: Improved accuracy of discrimination between IgM multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia by testing for MYD88L265P mutations. *British Journal of Haematology*, 2013, 161(6):902-4
318. Wilson W, Young R, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G et al : Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nature Medicine*, 2015, 21(8):922-6
319. Witzig TE, Kimlinger T, Stenson M, Therneau T: Syndecan-1 expression on malignant cells from the blood and marrow of patients with plasma cell proliferative disorders and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 1998, 31(1-2):167-75.
320. Wu R, Wang T, Shih I: The emerging roles of ARID1A in tumor suppression – *Cancer Biology & Therapy*. 2014, 1;15(6):655-64
321. Yan Q, Huang Y, Watkins AJ, Kocalkowski S, Zeng N, Hamoudi RA, et al : BCR and TLR signaling pathways are recurrently targeted by genetic changes in splenic marginal zone lymphomas. *Haematologica*. 2012, 97(4):595-8.
322. Yang Y, Schaffer A, Emre T, Ceribelli M, Zhang M, Wright G et al : Exploiting synthetic lethality from the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*, 2012: 723-37
323. Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, Manning R, Patterson C *et al* : A mutation in MYD88L265P supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, 2013; 122:1222-32
324. Yang G, Buhrlage S, Tan L, Liu X, Chen J, Xu L et al : HCK is a survival determinant transactivated by mutated MYD88, and a direct target of ibrutinib. *Blood*, 2016, 127(25):3237-52
325. Young R, Staudt LM: Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nature Reviews*, 2013, 12:229-243
326. Young R, Shaffer A, Phelan J, Staudt LM: B cell receptor signaling in diffuse large B cell lymphoma. *Semin Hematol*, 2015, 52(2):77-85

327. Zhang S, Smith S, Zhang S, Wang Y: Mechanisms of ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma. *British J of Haematol*: 2015: 445-456
328. Zhang Y, Roccaro A, Rombaoa C, Flores L, Obad S, Fernandes S et al : LNA-mediated antimiR-155 silencing in lox grad B-cell lymphomas. *Blood*, 2012, 120(8):1678-86
329. Zhou Y, Liu X, Xu L, Tseng H, Cao Y, Jiang J et al : Matrix metalloproteinase-8 is overexpresses in Waldenström's macroglobulinemia cells, and specific inhibition of this metalloproteinase blocks release of soluble CD27. *Clin Lymphoma Myeloma leuk*, 2011, 11(1):172-5
330. Zhou Y, Liu X, Xu L, Hunter Z, Cao Y, Yang G, Carrasco R, Treon S: Transcriptional repression of plasma cell differentiation is orchestrated by aberrant over-expression of the ETS factor SPIB in Waldenström macroglobulinemia. *Br J Haematol*, 2014, 166(5):677-89.
331. Zou Y, Kottmann A, Kuroda M, Taniuchi I, Littman D: Function of the chemokine receptor CXCR4 in hematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 1998, 393: 595-599
332. Xu L, Ciccarelli B, Hatjiharissi E, Adamia S, Zhou Y, Sun J, et al : 5-Azacytidine inhibits the mammalian target of rapamycin complex 1 signal and induces apoptosis in Waldenström's macroglobulinemia. *Blood*, 2008;Abstract 115.
333. Xu L, Hatjiharissi E, Ciccarelli BT, Roccaro AM, Adamia S, Sacco A, et al : Expression of the deleted in liver cancer-1 gene is regulated by DNA methylation and is a target for therapy in Waldenström's Macroglobulinemia. *Journal of Clinical Oncology (ASCO Post-Meeting Edition)*. 2008, 26(15S (Supplement)):19505.
334. Xu L, Hunter Z, Yang G, Cao Y, Liu X, manning R et al : Detection of MYD88L265P in peripheral blood of patients with Waldenström's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia*, 2014, 28(8): 1698-704
335. Xu L, Hunter Z, Tsakmaklis N, Cao Y, Yang G, Chen J,et al : Clonal architecture of CXCR4 Whim like mutations in Waldenström macroglobulinemia. *British Journal of Haematology*, 2016, 172(5): 735-44
336. Zerbini MCN, Soares FA, Velloso EDRP, Chaufaille MDLLF, Paes RP: World Health Organization classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues, 4th edition, 2008: major changes from the 3rd edition, 2001. *Revista Da Associacao Medica Brasileira* 1992. 2011;57(1):6-73.

VIII. ANNEXE 1

Article publié dans *Clinical Cancer Research*

Genomic landscape of *CXCR4* mutations in Waldenström's Macroglobulinemia

Stéphanie Poulain^{1,2,3}, Christophe Roumier^{2,3}, Aurélie Venet-Caillault², Martin Figeac⁴, Charles Herbaux^{3,5}, Guillemette Marot⁶, Emmanuelle Doye², Elisabeth Bertrand³, Sandrine Geffroy², Frédéric Lepretre⁴, Olivier Nibourel^{2,3}, Audrey Decambron¹, Eileen Mary Boyle^{3,5}, Aline Renneville², Sabine Tricot¹, Agnès Daudignon¹, Bruno Quesnel^{3,4}, Patrick Duthilleul¹, Claude Preudhomme^{2,3}, Xavier Leleu^{3,5,7}

1. Service d'Hématologie-Immunologie-Cytogénétique, Centre Hospitalier de Valenciennes, France
2. Laboratoire d'Hématologie, Centre de Biologie et Pathologie, CHRU de Lille, France
3. INSERM UMR 1172, IRCL, Lille, France
4. IFR114, Plateforme de Génomique, Lille, France
5. Service des Maladies du Sang, Hôpital Huriez, CHRU, Lille, France
6. Université de Lille, UDSL, EA2694 Biostatistics / Inria Lille Nord Europe, MODAL, Lille, France
7. Service d'Hématologie et Thérapie Cellulaire, Hôpital La Milétrie, CHU de Poitiers, Poitiers, France

Correspondance to Xavier Leleu, MD, PhD
Service d'Hématologie et Thérapie Cellulaire, Pôle Régional de Cancérologie
Hôpital de La Milétrie, CHU
2 Rue de la Milétrie
86021 Poitiers Cedex, FRANCE
Tel. +33 549 443 717
Email : xavier.leleu@chu-poitiers.fr

Running title. *CXCR4* mutation in Waldenström's macroglobulinemia

Scientific subheading. Neoplasia

Keywords. Waldenström's macroglobulinemia, *CXCR4* mutation, *MYD88*L265P

Word: 4281 **Statement translational relevance.** 129; **Abstract.** 235; **Tables.** 0; **Figures.** 6;
Supplementary data :table : 3 **References:** 32

This work was supported by the Comité Septentrion de la Ligue contre le Cancer et la Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies (FFRMG)

No conflict of interest.

Keywords. Waldenström's macroglobulinemia, *CXCR4* mutation, *MYD88*L265P

Statement of Translational relevance.

CXCR4 mutation has proved to be of critical importance in Waldenström's macroglobulinemia (WM), in part due to its role as a mechanism of resistance to several agents. We have therefore sought to unravel the different aspects of *CXCR4* mutations in WM and to characterize the genetic background using targeted NGS and SNP arrays. Mutational spectrum of 8 candidate genes involved in TLR, RAS and BCR pathway was studied in an integrative study. 25% of WM displays *CXCR4* mutation in C-terminal domain responsible for higher *CXCR4* expression. *CXCR4* mutations pertain to the same clone as to *MYD88* L265P mutations, with a clear-cut genomic signature traducing a more complex genome using SNP arrays but were mutually exclusive to BCR pathway mutations (*CD79A/B* mutations). *CXCR4* mutation identified a genomic subgroup of *MYD88*L265P WM.

Abstract.

Purpose Whole-genome sequencing has revealed *MYD88* L265P and *CXCR4* mutations (*CXCR4^{mut}*) as the most prevalent somatic mutations in Waldenström's macroglobulinemia (WM). *CXCR4* mutation has proved to be of critical importance in WM, in part due to its role as a mechanism of resistance to several agents. We have therefore sought to unravel the different aspects of *CXCR4* mutations in WM.

Experimental Design. We have scanned the 2 coding exons of *CXCR4* in WM using deep next generation sequencing and Sanger sequencing in 98 WM patients, and correlated with SNP array landscape and mutational spectrum of 8 candidate genes involved in TLR, RAS and BCR pathway in an integrative study.

Results. We found all mutations to be heterozygous, somatic and located in the C-terminal domain of *CXCR4* in 25% of the WM. *CXCR4* mutations led to a truncated receptor protein associated with a higher expression of *CXCR4*. *CXCR4* mutations pertain to the same clone as to *MYD88* L265P mutations, but were mutually exclusive to *CD79A* / *CD79B* mutations (BCR pathway). We identified a genomic signature in *CXCR4^{mut}* WM traducing a more complex genome. *CXCR4* mutations were also associated with gain of chromosome 4, gain of Xq and deletion 6q.

Conclusions. Our study panned out new *CXCR4* mutations in WM, and identified a specific signature associated to *CXCR4^{mut}*, characterized with complex genomic aberrations among *MYD88*L265P WM. Our results suggest the existence of various genomic subgroups in WM.

Introduction.

Whole-genome sequencing has revealed *CXCR4* as the second most frequent somatic mutation, identified in approximately 30% of Waldenström's macroglobulinemia (WM), similar to germline mutations found in the WHIM (Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, and Myelokathexis) syndrome (1-3). *MYD88* L265P mutations remain the most frequent mutation reported in WM to date, in nearly 90% of WM (4-5). Interestingly, *MYD88* L265P may act as a founder mutation because of its high frequency in WM; and thus it is suspected that a second hit may accelerate development and progression of the malignant clones leading to full-blown WM. Although the mechanism of deregulation of *CXCR4* axis is not fully understood in WM, it is possible that *CXCR4* mutation might represent one of these secondary events.

C-X-C chemokine receptor type 4 (*CXCR4*) is a G-protein-coupled receptor that plays an important role in lymphopoiesis and cell trafficking (2, 6), along with its ligand, the stromal cell-derived factor-1 (*CXCL12/SDF-1*). The *SDF1/CXCR4* axis promotes activation of several pathways including RAS, Akt and NF κ B and interplays with BCR pathway (6-8). The *CXCR4* gene is located on the long arm of chromosome 2 at position 21, and codes for a chemokine receptor that promotes migration and survival of various B lymphoid malignancies (8-10).

CXCR4 mutations were identified using Sanger sequencing by Treon et al . in nearly 25% of WM, and the *CXCR4* C1013G mutation was described as the most frequent recurrent *CXCR4* mutation in 7% (11). However, the occurrence of potential sub clonal of *CXCR4* mutation and the proportion of *CXCR4* mutation over the other known mutations was not available, in other word how this mutation lies in the architecture of the *MYD88* mutated clone. On contrary, Roccaro et al . have reported 30% incidence rate of the *CXCR4* C1013G mutation using qPCR, however they have solely studied this mutation (12).

In this study, we characterized the genomic landscape of *CXCR4* somatic mutation in a large cohort of 98 WM, combining deep sequencing of target genes allowing study of the clonal architecture in the WM cells, including sub clonal analysis, and to confirm the incidence rate of these mutations and single polymorphism nucleotide array (SNPa) to decipher the genomic landscape of *CXCR4* mutated WM.

Patients and methods.

Patients. 98 patients diagnosed with WM were included in this study (63 males, 35 females). The diagnosis and treatment initiation criteria of WM were as published (13-14). Among the cohort with available clinical follow up (n= 93), 68 patients were treated. First line treatment was initiated at diagnosis in 41% of the patients. Front line therapy included chloraminophene alone in 12 cases, fludarabine alone in 3 cases, rituximab (R) alone in 3 cases or in association with chemotherapy in 51 cases (dexamethasone – R- cyclophosphamide in 19 cases, bortezomib-R- dexamethasone in 7, R- bendamustine in 5 cases). Patients were untreated at time of bone marrow (BM) collection and gave

informed consent prior to research sampling. No familial form of WM was included.

Cell selection. Research sampling consisted of bone marrow (BM) samples and blood cells for all WM. All samples were enriched using immunomagnetic beads (B cell isolation kit for tumoral cells from bone marrow sample, and Pan T cell isolation kit, Myltenyi-Biotec, USA), following Ficoll-paque gradient centrifugation. The purity of samples was confirmed by multiparameter flow cytometry using a marker combination (including CD19, kappa, lambda, CD2, CD38, CD138 and CD27). More than 90% a light-chain-isotype-positive B cells was detected in all cases (mean: 95,8% of tumoral cells) (15).

DNA sequencing. DNA was extracted from isolated cells using Qui Amp kit (Sigma-Aldrich Co. Saint-Quentin Fallavier, France). *MYD88* L265P, *CD79A* and *CD79B* mutation was analysed as previously described (16)) in 98 patients. C-terminal *CXCR4* gene was amplified from genomic DNA by PCR as previously described (n= 98 patients) (5). All the exons of *CXCR4* gene were analyzed using Targeted next generation sequencing (NGS) in a cohort of 53 patients. NGS was analyzed using the Ion Torrent PGM platform (Life biotechnologies, CA, USA). Amplicons covering the regions of interest were designed with an amplicon length of 150 to 250 bp. Libraries were sequenced with 200-bp read length on a 318 chip. Mutation calling was performed using the torrent suite variant caller under the low stringency somatic settings (TS4.0). We have studied *CXCR4* mutations along with *MYD88* L265P (exon 5), *CD79A* (ITAM domain), *CD79B* (ITAM domain), *CARD11* (exon 5-9), *N-RAS* (exon 2-3), *K-RAS* (exon 2-3), *BRAF6* (exon 15) and *PTEN* (exon 5+7) using NGS (n=53).

To quantify the mutated clone, we have analysed the VAF (Variant allele frequency) defined as the number of reads that mapped each studied to this position, cover the variant base and show the reference allele, divided by all fragments covering the site. VAF was corrected by the percentage of tumoral cells in B cell selected sample. Mutation calls were considered positive when called by at least 20 variants reads. Complete sequence data of the coding and splice site regions of *CXCR4* were generated at a mean depth coverage of 2000X per nucleotide. NGS assay also allowed a better assessment of the percentage of *CXCR4* mutant allele whose sensitivity is of 1%.

Gene expression profiling. Gene expression profiling (GEP) was performed using U133A arrays (Affymetrix, USA) for 7 of the WM patients. Total RNA was extracted from purified B tumoral cells population isolated from BM using the Trizol method. Expression data were normalized using the Robust Multi-array Average (RMA) algorithm. Differential gene expression was analyzed with the Bioconductor R package "limma", which is well known to improve variance modeling when the number of replicates is small. All probes with an adjusted p-value under 0.05 were considered differentially expressed. Their normalized expression values were then represented in a heatmap, whose colors vary according to the standardized by row values of the input data. In parallel, a gene set enrichment analysis (GSEA) was performed for several gene sets among them the C2 collection of the MSigDB (Supplemental data Table 1-2). The PGSEA package (17) was used to calculate z-scores for

all gene sets and p-values were adjusted for multiple testing (18).

Cytogenetic analysis, FISH, Single Nucleotide Polymorphism Array analysis (SNPa) and Immunophenotypic studies. Genome-wide detection of CNA and LOH was performed using the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, CA, USA). Conventional cytogenetic analysis was performed on DSP30 + IL2 stimulated BM cells. Fluorescent in-situ hybridization (FISH) was performed to detect chromosomal aberrations: 6q23 deletion, 17p12, 11q22 deletions, 13q14 deletion, trisomy 12, trisomy 4 (n=90)(15). Immunophenotypic expression of CXCR4 (R et D systems, UK), CD49d, CD27, CD80, CD86, CD138 gating on CD19+ cells was performed along with CD38 (Immunotech, France) and determination of the Matutes's score by flow cytometry. The ratio of mean fluorescence intensity (MFIR) was calculated as the ratio of specific fluorescence with an isotype control.

The relationships between the clinical, biological, and molecular parameters were determined using a nonparametric test (Mann–Whitney), a T test, a Chi2 or Fisher's exact test when appropriate. Correlations were tested through Spearman correlation coefficient. The differences between the results of the comparative tests were considered statistically significant if P-value (p) < 0.05. All statistical analysis were done with the SPSS 15.0 software. Survival was studied using Kaplan Meier test, comparison were made with Log Rank test

Results.

New CXCR4 mutations identified in WM. We have first used NGS (deep sequencing) to screen the entire sequence of CXCR4 (n=53 WM samples) with a greater sensitivity and to quantify the allelic frequency of the variant of CXCR4 mutations in B selected cells. We have identified 14/53 (26.4%) WM with CXCR4 mutations. We then confirmed the observed mutations using NGS using Sanger sequencing (SaS) and extend to the entire cohort of 98 WM patients (including the 53 done by NGS). We identified CXCR4 mutations (CXCR4^{mut}) for a total of 24/98 (24.5%), and we have characterized several new mutations across the entire coding exons of CXCR4 (Figure 1).

Overall, 17 different mutations were identified in CXCR4, including 12 that we have described for the first time in WM. Interestingly, only one type of CXCR4 mutation was observed in either patient, and all mutations identified were located in the 45 amino acid intra-cytoplasmic carboxy-terminal tail. These mutations were never observed in the paired T lymphocytes, and thus confirmed their somatic feature. All mutations were heterozygous, and no UPDa (acquired uniparental disomy, loss of heterozygosity without variation of copy number) was observed at CXCR4 locus nor variation of copy gene number (gain or deletion) in our cohort, using SNP array.

High allelic frequency of CXCR4 mutation in WM. NGS also allowed the quantification the allelic frequency of the variant of CXCR4 mutations. This quantification allows to conclude for the percentage of mutation in the clonal population for a given patient, and thus to differentiate between clonal (dominant clonal) and subclonal. The mutation load of CXCR4 varied from 13.5% to 47.58%

(mean: 35.2%) using the VAF (n=14 *CXCR4*^{mut} WM in our series). Interestingly, for 12 WM, the high VAF of *CXCR4* mutation was suggested to be present in the dominant clone. However, we were also able to identify the presence of *CXCR4* mutations at the sub-clonal level in 4 patients using NGS, and for these 4 patients the VAF varied from 13.5% to 26% (Figure 2).

Non-sense (*CXCR4*^{NS}) and Frameshift (*CXCR4*^{FS}) *CXCR4* mutations lead to truncation of *CXCR4* C-terminal. Among the *CXCR4* mutations observed, 11/24 (45,8%) and 13/24 (54.2%) were non-sense (*CXCR4*^{NS}) and frameshift (*CXCR4*^{FS}) mutations, respectively. The most frequent mutation was the C1013G (S338X) mutation (5/98, 5.1%) followed by C1013A (S338X) (3/98, 3%). The modelisation of C1013G/*CXCR4* and C1013A/*CXCR4* variants predicts a stop codon in place of a serine at amino acid position 338 (S338X). We also found several other mutations to S338, suggesting a hot spot locus in *CXCR4* gene. The S338 hot spot mutation was targeted in 50% of mutated cases in WM. Other *CXCR4*^{NS} mutations were here described. Interestingly, the exact same acquired R334X mutation in WM was also previously described in the constitutional WHIM syndrome (19).

Increased expression of *CXCR4* in WM with *CXCR4*^{mut}. Since we observed that all mutations were located in the C-terminal tail of *CXCR4*, and that this C-terminal domain plays a critical role in the desensitization process that contributes to the regulation of the signal transduction and *CXCR4* expression (2); we then sought to study the impact of *CXCR4* mutation on the expression of *CXCR4* on the membrane of WM tumour cells using flow cytometry. *CXCR4* was expressed in all cases (n=53), including the 12 *CXCR4*^{mut} patients. The pattern varied widely using the MFIR to evaluate the *CXCR4* expression (MFI varied from 4.6 to 148.7). However, there was a significant greater expression of *CXCR4* protein in WM with *CXCR4*^{mut} (p=0.003) (Figure 3). This increased expression was observed independently of the type of mutation (data not shown).

Phenotypic signature associated to *CXCR4*^{mut} genotype.. *CXCR4* directly interacts with CD49d in response to CXCL12 signalling in regulating migration and adhesion of WM cells to the bone marrow microenvironment (10). CD49d favours lymphocyte homing by cooperating with *CXCR4* in stromal cell adhesion and extra cellular matrix (9). We then studied the impact of *CXCR4* mutation on the expression of the integrin VLA4 (CD49d) using flow cytometry (n= 53). CD49d was expressed in all WM cases; but no difference in CD49d expression was observed according to *CXCR4* mutation. In contrast, a higher expression of CD49d was observed in WM with *MYD88* L265P mutation (p=0.048) (Figure 3). Similarly, we found no difference in CD38 expression according to *CXCR4* mutation, despite of the known functional link between *CXCR4*, CD49d and CD38 (20). CD138 mediates cell adhesion to the extra cellular matrix and is a marker of plasmacytic differentiation (21). Interestingly, we found a significant lower expression of CD138 (syndecan1) in the *CXCR4*^{mut} group (p=0.034). We found no difference in the CD27, CD23, CD10, K/L expression and the Matutes score between *CXCR4*^{mut} and *CXCR4*^{wild} subgroups.

Genomic signature of *CXCR4*^{mut} WM. We then sought to study whether a specific high throughput

SNPa signature was associated to *CXCR4*^{mut} WM in a series of 53 WM including 12 *CXCR4*^{mut}. For this analysis we have considered ‘presence of one’ as any genomic abnormality including gain, loss and or copy number without loss of heterozygosity (CN-LOH), identified using SNPa. In this first analysis, we have compared presence versus absence of genomic abnormality according to presence of *CXCR4* mutation. We found a relationship between *CXCR4*^{mut} and a greater frequency of genomic aberrations in WM compared to *CXCR4*^{wild} (91% versus 68%, p=0.010).

We then evaluated the number of genomic abnormality as a reflection of the genomic complexity based on the number of SNP abnormalities. We found that *CXCR4* mutated WM had a greater mean number of abnormality (5.8 versus 2.8 per patient, p=0.046). No significant difference was observed between WM with clonal or subclonal *CXCR4* mutation.

Furthermore, we analysed the relationship between *CXCR4* mutation and certain type of SNP aberration. We have observed that WM with *CXCR4*^{mut} had a greater incidence rate of trisomy 4 (complete or partial), 58% versus 12% respectively (p=0.002); a greater frequency of gain of Xq, including MYD88 pathway-based *IRAK1* gene, and of deletion 8 p (p=0.002 and p=0.007, respectively) (Figure 4). Finally, we also found a greater frequency of deletion 6q, including the NFkB pathway-based *TNFAIP3* gene (p=0.038). We found no relationship to deletion 7q, deletion 11q, deletion 17p, deletion 13q14, trisomy 18 in our study. No difference of SNPa feature was observed accordingly the type of *CXCR4* mutation (non-sense (*CXCR4*^{NS}) versus frameshift (*CXCR4*^{FS}) mutations.

Mutational landscape of *CXCR4*^{mut} WM. We next attempted to delineate the mutational spectrum and intratumoral heterogeneity related to presence of *CXCR4*^{mut} for genes involved in the RAS (this pathway may be activated by CXCR4/protein G proteins), B Cell Receptor (BCR) and Toll like receptor (TLR) pathways (*MYD88* exon 5), known to be interconnected with CXCR4 pathway, using targeted NGS (6).

When looking at the incidence rate of the *CXCR4* mutations with presence of *MYD88* L265P mutation in the cohort of 98 patients, it appeared that 23/24 (95.8%) of the *CXCR4*^{mut} were *MYD88* L265P mutated, except one WM with a *CXCR4*^{FS} mutation. The high correlation between *MYD88* L265P and *CXCR4* mutational loads tends to suggest the coexistence of the 2 mutations in the same clone (Figure 2). However, in 4 WM, a lower VAF of *CXCR4* in comparison to *MYD88* L265P suggested a subclonal *CXCR4* mutation in the dominant clone harbouring *MYD88* mutation.

Regarding the presence of mutations in the RAS pathway in WM, including PTEN, K-Ras and N-Ras, crucial regulators of RAS pathway, we have not identified any mutation in our cohort (n=53).

BCR pathway can be constitutively activated, either by signals from the microenvironment or by genetic aberration (22). Several mutations of key signalling molecules and regulators of the BCR pathway were reported overtime, particularly in the activated B-cell-like (ABC) DLBCL and in WM (15, 23), including the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signalling modules of

the CD79A and CD79B BCR co-receptors and the coiled-coil domain of CARD11 (22). Mutations of *CD79B* and *CD79A* were observed in 12/98 (12.2%) of WM. Interestingly, we found no co-existence of *CXCR4^{mut}* and *CD79A/CD79B* mutations, but in one patient that had *CXCR4^{mut}* at the sub clonal level. No mutation of *CARD11* was observed in our studied group (n=53). One might conclude that there is no unique somatic mutation in the BCR pathway, but instead a wide variety of molecules that could be altered through molecular alterations in the BCR pathway, likely mutually exclusive in the same clone, such as *CXCR4^{mut}* and *CD79A/CD79B* mutations in the present situation in our study.

Transcriptional signature related to presence of *CXCR4* mutation. We finally studied the gene expression profile of WM on 7 WM to understand whether the *CXCR4* mutation impacted the gene expression and to identify a potential gene signature of WM with *CXCR4^{mut}*. The differential analysis allowed to identify a gene signature attached to the *CXCR4^{mut}* molecular profile, corresponding to 32 probes and 27 genes. We found several genes among these, such as MMP8, CRISP3 or BRCC3 involved in cell death and survival or cell movement (ARG1, LYST). These probes were all under-expressed in the five *CXCR4^{wild}* WM compared to the two *CXCR4^{mut}* WM (Figure 5, Supplemental data Table1-2). We then sought to identify deregulated pathways using Ingenuity® analysis software. We found *CXCR4^{mut}* to be related to several functional network networks such as cell cycle and DNA replication or cell-to-cell signaling and interaction, cellular growth and proliferation. Using GSEA for targeted gene sets previously associated with *CXCR4* mutation (12), we also identified deregulation of proteasome pathway and BCR / B lymphocyte pathway in *CXCR4^{mut}* WM (p=0.01 and p=0.04, respectively) (Supplemental data Table 1).

Clinical and biological features of *CXCR4^{mut}*. We thought to identify clinic-biological characteristics of WM according to *CXCR4^{mut}* features. The median age was 67 years (range: 36-92) in our series. We found that *CXCR4^{mut}* was associated to a higher IgM monoclonal component (r=.309; p=.006) and thrombocytopenia (r=-.226; p=.048), markers of adverse prognosis in WM. Indeed, 35% and 12% of patients had serum IgM level greater than 30g/L (p=0.023), and 27% and 6.5% of patients had low platelet count lower than 100 G/L (p=0.018), respectively in patients with *CXCR4^{mut}* versus *CXCR4^{wild}*. There was a trend for *CXCR4^{mut}* patients to have more often IPSS WM stage 3 (p=0.086). No association was found with regard to other markers of tumoral syndrome, such as adenopathy and splenomegaly, extra medullary localization or lymphocytosis (one would consider a marker of egression of tumoral cells from the bone marrow)(Supplemental data: Table 3). With a median follow-up of 6 years, 21 (22%) patients in our series had died with a median OS (IC95%) not reached, and estimated at 63% at 10 years. No significant difference in type of treatment or number of treatment line was observed (data not shown). The estimated OS at 10 years according to *CXCR4^{mut}* status was lower for *CXCR4^{mut}* patients, 50% versus 65.5% for patients with *CXCR4^{wild}* (p=ns, Figure 6). Interestingly, the difference on OS between *CXCR4^{mut}* versus *CXCR4^{wild}* became significant in patients

with indolent WM (estimated 5-years OS at 50% and 93%, respectively, $p=0.019$); the *CXCR4*^{mut} patients required therapy more often and much earlier than the *CXCR4*^{wild}.

Discussion.

We have described 12 new *CXCR4* mutations for a total of 17 in WM so far, observed in 25% of patients with WM, using targeted deep sequencing. This data suggests a highly heterogeneous pattern of *CXCR4* mutations in WM, and confirms using a more sensitive technique that was reported by Treon et al . using Sanger (11). We have also confirmed *CXCR4* 1013C>G, followed by 1013C>A, mutations to be the most frequent *CXCR4* mutations in WM, although in a lesser frequency as previously reported, 12.5% (for the 2 mutations using Sanger sequencing in CD19 selected cells) and 30% (only 1013C>A using allele specific PCR in unselected tumoral samples) in Treon et al . and Roccaro et al ., respectively (11-12). Overall the high frequency of *CXCR4* Whim like mutation is a new hallmark of WM (12, 24).

Interestingly, all mutations, either non-sense or frameshift, occurred in the C-terminus of *CXCR4*. It was suggested that the truncation of the distal amino acid region of the C-terminus known to regulate signalling of *CXCR4* by CXCL12, might deregulate the *CXCR4*/SDF1 axis signalling pathway and thus participate to the pathogenesis of WM (2, 11-12, 25). One might propose that the type of mutation does not matter much in WM, on the contrary to the loss of C-terminus domain of *CXCR4* protein which modified function might play a role in WM pathogenesis (2). Functional studies may confirm this hypothesis in the near future.

We found a greater *CXCR4* expression on tumour cells of WM carrying *CXCR4* mutation, independently of the type of mutation, similar to that was described in WHIM syndrome. It is suggested that the increase of *CXCR4* receptor expression would induce an altered migration profile in response to SDF1 (25), resulting in an increased egression of tumour cells as demonstrated in mouse model (12). In our study, we also found a decreased expression of CD138, a cell surface syndecan-1 that mediates cancer cell adhesion to the extra cellular matrix, and alteration of expression of several genes involved in matrix degradation such as MMP8 or cell migration on gene expression profiling. Taking together, *CXCR4* mutation might alter the ability of the tumour cells to interact with the BM microenvironment in WM, as shown in *CXCR4* S338X cells (12).

Nearly all WM patients with *CXCR4* mutations harboured the *MYD88* L265P mutation, as initially described by Treon et al suggesting a potential cooperation between these pathways (11). An important dataset obtained in our series came from the quantification of the allelic frequency of the variant (VAF) of *CXCR4* mutations into tumoral cells using NGS that may identify minor subclones of less than 1% in our study. Targeted deep sequencing allows to conclude for the percentage of mutations in the clonal population for a given patient, and thus to differentiate between clonal (dominant clonal) and subclonal mutations. Combining analysis of VAF of several genes, *CXCR4*

mutation was expressed in the same clone as *MYD88* L265P, as we have identified a high allelic frequency of *CXCR4* mutation *MYD88* L265P in WM tumour cells; but for 4 patients that had *CXCR4* mutation present only at the sub-clonal level. Overall, this data may suggest the following hypothesis, where *MYD88* L265P mutation is a founder mutation in WM, a first genetic hit that would promote NF- κ B and JAK-STAT3 signalling (4, 26). Direct inhibition of *MYD88* L265P signalling overcomes CXCL12-triggered survival effects in *CXCR4* mutated cells, supporting a primary role for *MYD88* signalling in WM (25). *CXCR4* could then be one of the secondary events in some patients that showed subclonal mutation of *CXCR4* compared to *MYD88* L265P mutation present in the main clone. However, longitudinal analysis studies are needed to explore the dynamic of clonal architecture to identify driver or additional mutations in WM that could contribute to clinical progression or chemoresistance. Indeed, it was shown that a diminished clinical activity of ibrutinib was observed in WM patients with *CXCR4* mutations (25;30).

Additionally, we also found absence of co-occurrence of *CD79A/CD79B* and *CXCR4* mutations in WM. These data may suggest that these types of activating mutations of BCR and *CXCR4* pathway were mutually exclusive in *MYD88* L265P WM (6). A cooperation between *CXCR4* and TLR signalling activated by *MYD88*L265P mutation was described in B cells (6). The functional role of mutations in the BCR pathway is not fully described in WM, but *CD79B* mutation was shown to alter the BCR response in diffuse large B lymphoma (15, 23). We might thus suggest the existence of two sub-groups of *MYD88* L265P WM, one with *CXCR4* mutations and one with BCR pathway mutations that may involve in cooperation with the aforementioned driver mutation which primarily affect TLR signalling. This data further may advance the concept that a complex rather than a unique deregulation of the TLR/NF κ B pathway characterizes *MYD88* L265P WM with others interconnected pathways.

We have observed that *CXCR4* mutation was more frequently associated to a complex genomic signature, including gain of chromosome 4, deletion 6q and gain of chromosome X using SNP α . High throughput genomic studies have identified multiple mechanisms of genetic changes in WM including several recurrent copy number alterations such as deletion 6q, deletion 13q or gain of chromosome 4 and CN-LOH (15, 27). This genomic pattern segregates further WM among the others B- cell tumors. The prognostic role of these genomic alterations is not fully understood, but the presence of more than 3 SNP α abnormalities was associated with symptomatic status (15, 27-28). Taking together, this finding suggests an inter and intraclonal heterogeneity and the potential selective advantage of specific combinations of genetic lesions in WM, in particular in the subset of *CXCR4*^{mut} WM. The understanding of these genomic abnormalities, including gene mutations and copy number alterations, described herein might help deciphering the pathogenesis of WM in order to determine associated risk of progression, relapse and drug resistance.

Overall, WM with *CXCR4* mutation had a specific clinico-biological and genomic signature associated to features characterized with adverse prognosis in WM, including high IgM M-spike and

thrombocytopenia (part of the IPSS WM score adverse features) and greater frequency of complex genomic aberrations pattern using SNP array. Our data therefore may suggest a worse prognosis for *CXCR4* mutation subgroup of asymptomatic WM, but we didn't observe significant impact on overall survival in our cohort as previously described (11). Further studies are needed to explore the prognosis value of *CXCR4* mutation in WM in clinical trials. Interestingly, the potential clinical impact of WM with *CXCR4* mutation has already been suggested by Roccaro et al . and Treon et al . on the basis of their *in vitro* studies showing drug resistance in *CXCR4* mutated WM cells exposed to BTK-, mTOR- and Pi3K inhibitors, but not proteasome inhibitors (29-30). This study, along with other, thus led us to propose that it is primetime for a systematic evaluation of *CXCR4* mutation as part as the pretreatment package of WM, in order to identify patients with *CXCR4* mutation that might benefit more from proteasome inhibitors as compared to other options, such a BTK inhibitors.

In conclusion, approximately 25% of WM harbour *CXCR4* mutation, leading to altered *CXCR4* protein at the C-terminal end, irrespective of the pleiotropic pattern of mutations. The study of *CXCR4* mutations showed existence of intraclonal (variation in co-expression of *MYD88* and *CXCR4* mutations) and interclonal (*BCR* and *CXCR4* mutations in MYD88L265P WM) heterogeneity when analysing the molecular landscape of *CXCR4* mutation in WM. Patients with *CXCR4* mutation displayed a specific clinico-biological-genomic and transcriptomic signature, possibly related to specific physiopathological mechanism related to *CXCR4* mutation. This dataset further suggests the genomic heterogeneity of WM, beyond the current indolent versus symptomatic classification.

Acknowledgements.

We thank Pauline Vandycke, Valérie Grandières, Claudine Delsaut, Axelle Séghir and Sabine Ranwez for their excellent technical assistance.

Contribution of authors.

Conception and design: XL, SP

Collection and assembly of data: SP, CR, ED, MF, FL, AVC, EB, EMB, ON, AD, AR, ST, AuD, BQ, CP, PD, XL

Gene expression profiling: CH, GM, SG

Data analysis and interpretation: SP, CR, AVC, MF, GM, XL

Manuscript writing: XL, SP

Figure 1. Somatic mutations in C terminus of CXCR4 identified by Sanger sequencing and targeted NGS in WM patients. List of CXCR4 mutations observed in our study, N: Number of patients. The mutations previously reported in WM by Treon et al . are noted with *. In the schematic structure of CXCR4, sites of mutation are highlighted in blue (frame shift mutation) or gray (non sense mutation). The S338 hot spot was represented in black.

Figure 2. Representation of variant allelic frequency (VAF) of CXCR4 and MYD88 mutation in each patient using NGS. Each row represents a patient (X axis). VAF of MYD88 L265P mutation is represented in light grey, CXCR4 VAF in black. Percentage indicates allele frequencies determined by NGS corrected by the percentage of tumoral cells in the B selected samples in each 53 patients (Y axis).* indicates subclonal CXCR4 mutation in WM patients.

Figure 3. Expression of CXCR4 and CD49d according to MYD88 and CXCR4 mutation status. Box plots are shown with an overlay of the individual data points. ns: not significant

Figure 4. Association network of genomic alterations in WM. The heatmap represents co-occurrence of CXCR4 mutation with other genetic alterations analyzed in 53 patients with WM using SNPa, cytogenetic and FISH. The co-occurrence of CXCR4 mutation with other genetic alterations was represented using MeV software (TM4 microarray software suite) (31-32). Each row corresponds to key locus or regulator genes of the canonical and non-canonical NF-kB pathways targeted by CNA, UPD or mutation in WM. The columns represent individual patients colour coded on the base of gene status. Each patient is represented by a virtual column (black = mutation, CN LOH = deletion or gain of gene; grey = wild type).

Figure 5. Gene expression profiling. Heatmap of normalized expression values for differentially expressed probes. Colors vary according to the standardized by row values of the input data. The scale of the gene-expression data is indicated. Some genes of interests are highlighted.

Figure 6. Overall survival according to presence or absence of CXCR4 mutation in WM. The solid line indicates the CXCR4^{wild} patients, the dashed line CXCR4^{mut} patients. ns= not significant.

References.

1. 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;123:1637-46.
2. Al Ustwani O, Kurzrock R, Wetzler M. Genetics on a WHIM. *Br J Haematol* 2014 Jan;164:15-23.
3. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, et al . Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* 2003;34:70-4.
4. 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* 2012;367:826-33.
5. 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;167:506-13.
6. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Re.* 2014;124:31-82.
7. Conley-LaComb MK, Saliganan A, Kandagatla P, Chen YQ, Cher ML, Chinni SR. PTEN loss mediated Akt activation promotes prostate tumor growth and metastasis via CXCL12/CXCR4 signaling. *Mol Cancer* 2013;12:85.
8. Nie Y, Waite J, Brewer F, Sunshine MJ, Littman DR, Zou YR. The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med* 2004 ;200:1145-56.
9. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Bio.* 2014 ;24:71-81.
10. 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 ;112:150-8.
11. 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 Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2014 ;123:2791-6.
12. Roccaro AM, SaccoA, 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* 2014,123:4120-31
13. Owen RG, Pratt G, Auer RL, Flatley R, Kyriakou C, Lunn MP, et al . Guidelines on the diagnosis and management of Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haemato.* 2014;165:316-33.

14. Dimopoulos MA, Kastritis E, Owen RG, Kyle RA, Landgren O, Morra E, et al . Treatment recommendations for patients with Waldenström macroglobulinemia (WM) and related disorders: IWWM-7 consensus. *Blood* 2014;124:1404-11.
15. Poulain S, Roumier C, Galiegue-Zouitina S, Daudignon A, Herbaux C, Aijjou R, et al . Genome wide SNP array identified multiple mechanisms of genetic changes in Waldenström macroglobulinemia. *Am J Hematol* 2013;88:948-54.
16. Poulain S, Roumier C, Decambron A, Renneville A, Herbaux C, Bertrand E, et al . MYD88 L265P mutation in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2013;121:4504-11.
17. Kim SY, Volsky DJ. PAGE: parametric analysis of gene set enrichment. *BMC Bioinformatics*. 2005;6:144.
18. Hochberg Ba. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 57. 1995:289–300
19. Taniuchi S, Masuda M, Fujii Y, Izawa K, Kanegane H, Kobayashi Y. The role of a mutation of the CXCR4 gene in WHIM syndrome. *Haematologica* 2005;90:1271-2.
20. Dal Bo M, Tissino E, Benedetti D, Caldana C, Bomben R, Del Poeta G, et al . Microenvironmental interactions in chronic lymphocytic leukemia: the master role of CD49d. *Semin Hematol* 2014 ;51:168-76.
21. Teng YH, Aquino RS, Park PW. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol* 2012 ;31:3-16.
22. Lim KH, Yang Y, Staudt LM. Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF-kappaB in lymphoid malignancies. *Immunol Rev* 2012 ;246:359-78.
23. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al . Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010 ;463:88-92.
24. Martinez N, Almaraz C, Vaque JP, Varela I, Derdak S, Beltran S, et al . Whole-exome sequencing in splenic marginal zone lymphoma reveals mutations in genes involved in marginal zone differentiation. *Leukemia* 2014 ;28:1334-40.
25. Cao Y, Hunter ZR, Liu X, Xu L, Yang G, Chen J, et al . CXCR4 WHIM-like frameshift and nonsense mutations promote ibrutinib resistance but do not supplant MYD88(L265P) -directed survival signalling in Waldenström macroglobulinaemia cells. *Br J Haematol* 2015;168:701-7.
26. Wang JQ, Jeelall YS, Beutler B, Horikawa K, Goodnow CC. Consequences of the recurrent MYD88(L265P) somatic mutation for B cell tolerance. *J Exp Med* 2014;211:413-26.
27. Braggio E, Philipsborn C, Novak A, Hodge L, Ansell S, Fonseca R. Molecular pathogenesis of Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica* 2012 ;97:1281-90.
28. 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* 2013;98:649-54.

29. 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;123:4120-31.
30. Cao Y, Hunter ZR, Liu X, Xu L, Yang G, Chen J, et al . The WHIM-like CXCR4(S338X) somatic mutation activates AKT and ERK, and promotes resistance to ibrutinib and other agents used in the treatment of Waldenström's Macroglobulinemia. *Leukemia* 2015 ;29:169-76.
31. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, et al . TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* 2006;411:134-93.
32. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et al . TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003;34:374-8.

Figure n°1

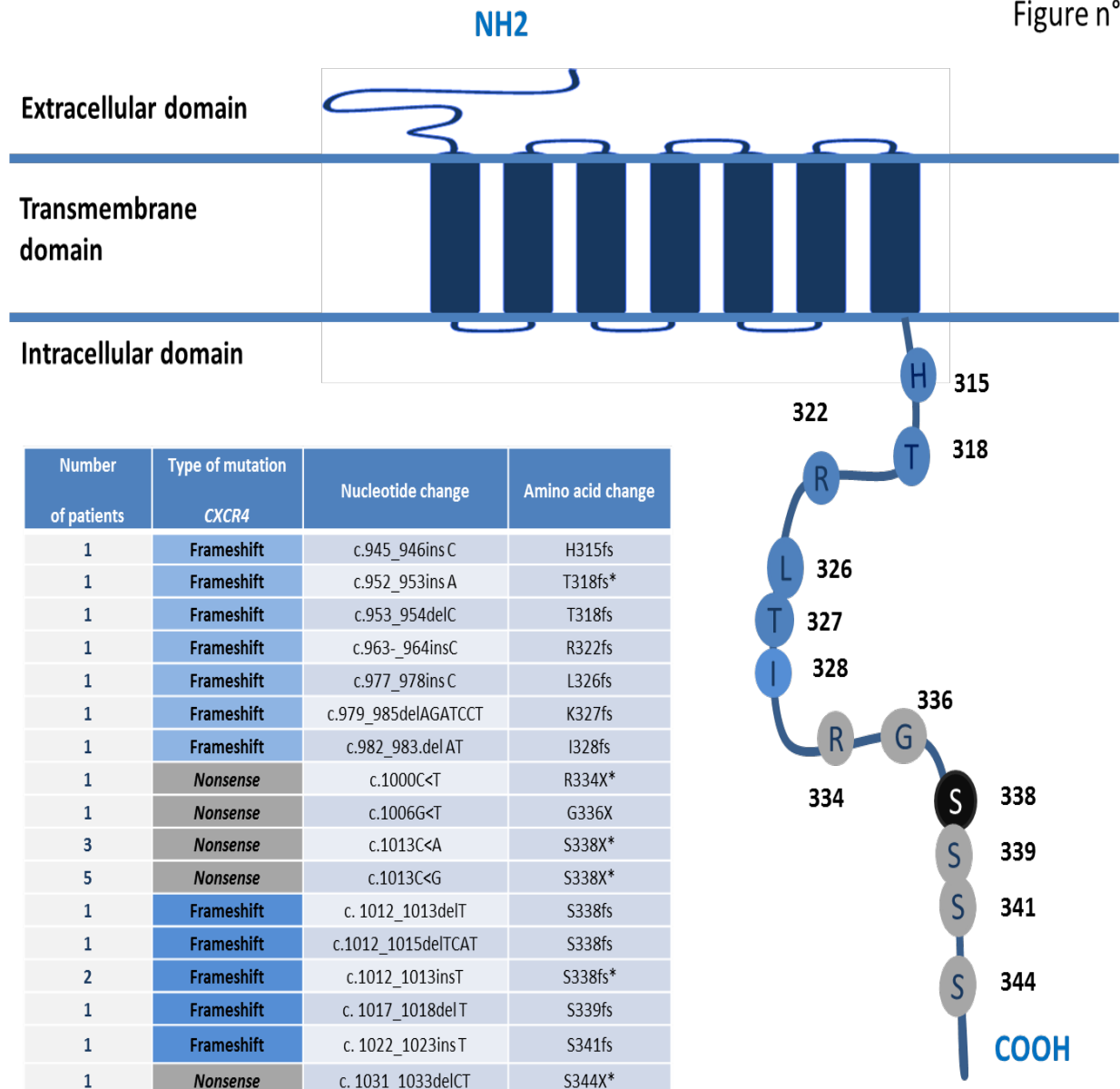


Figure 2

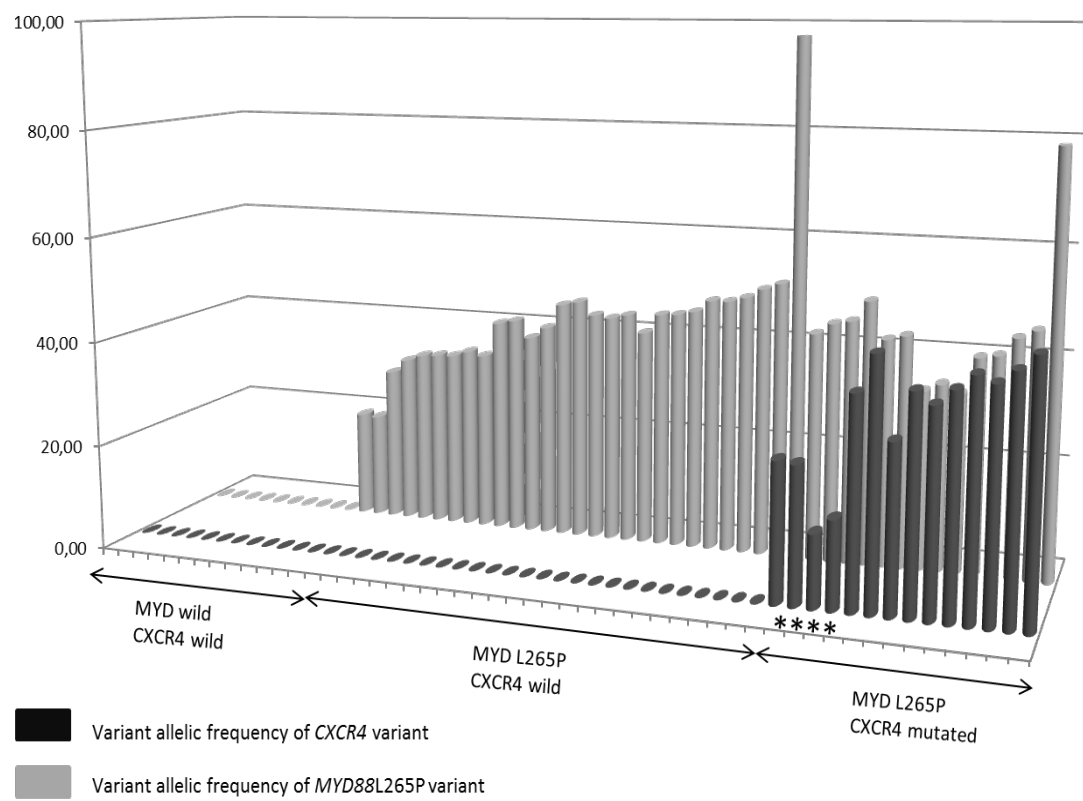


Figure 3

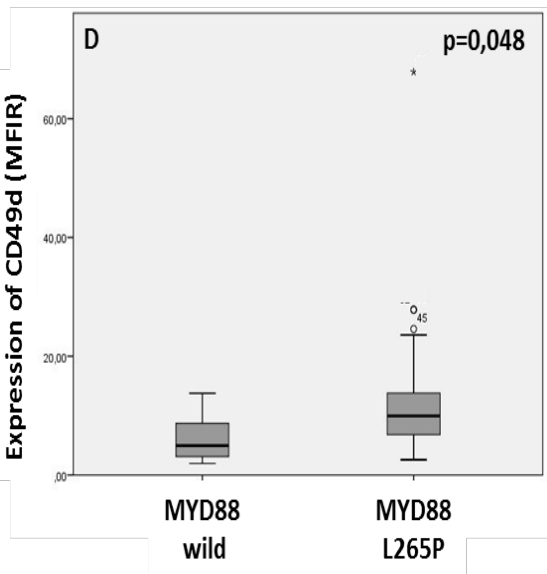
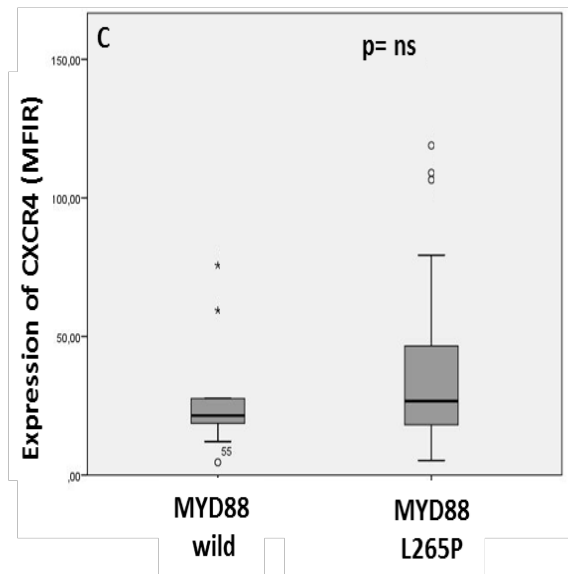
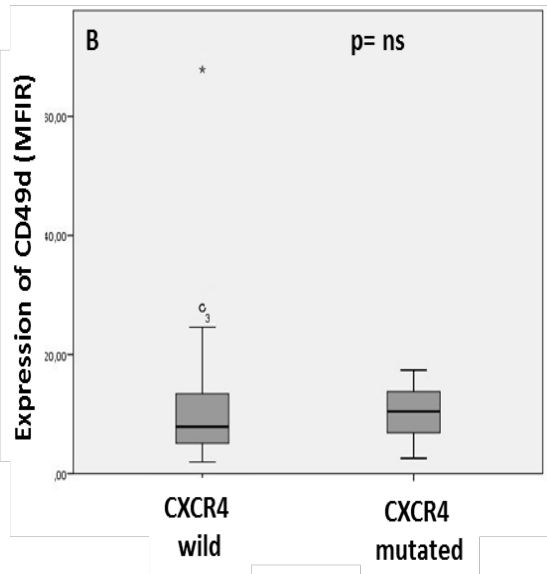
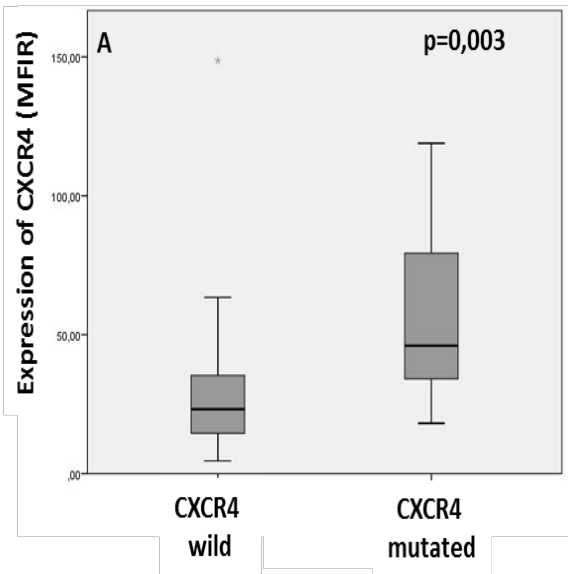


Figure 4

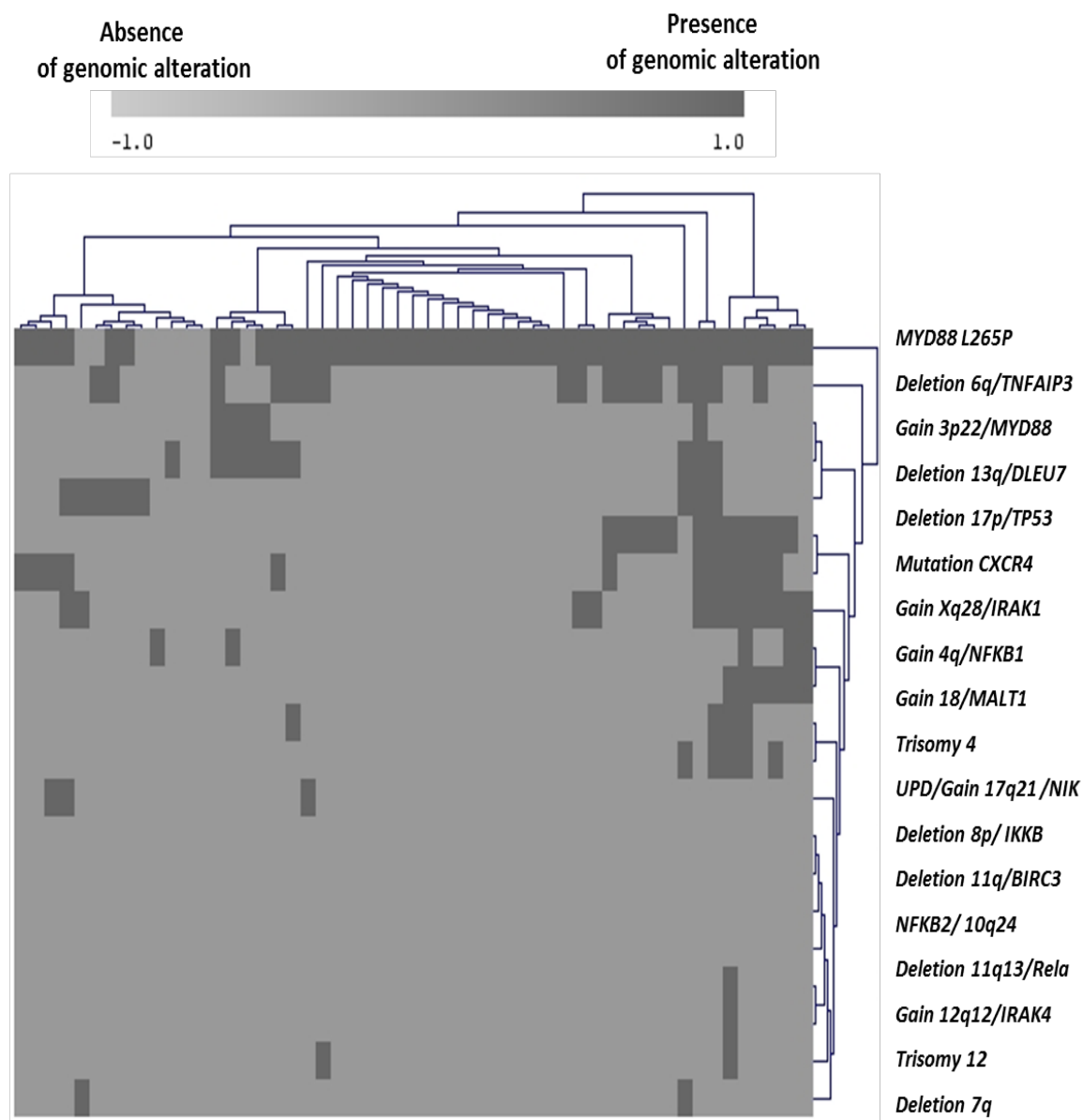


Figure n°5

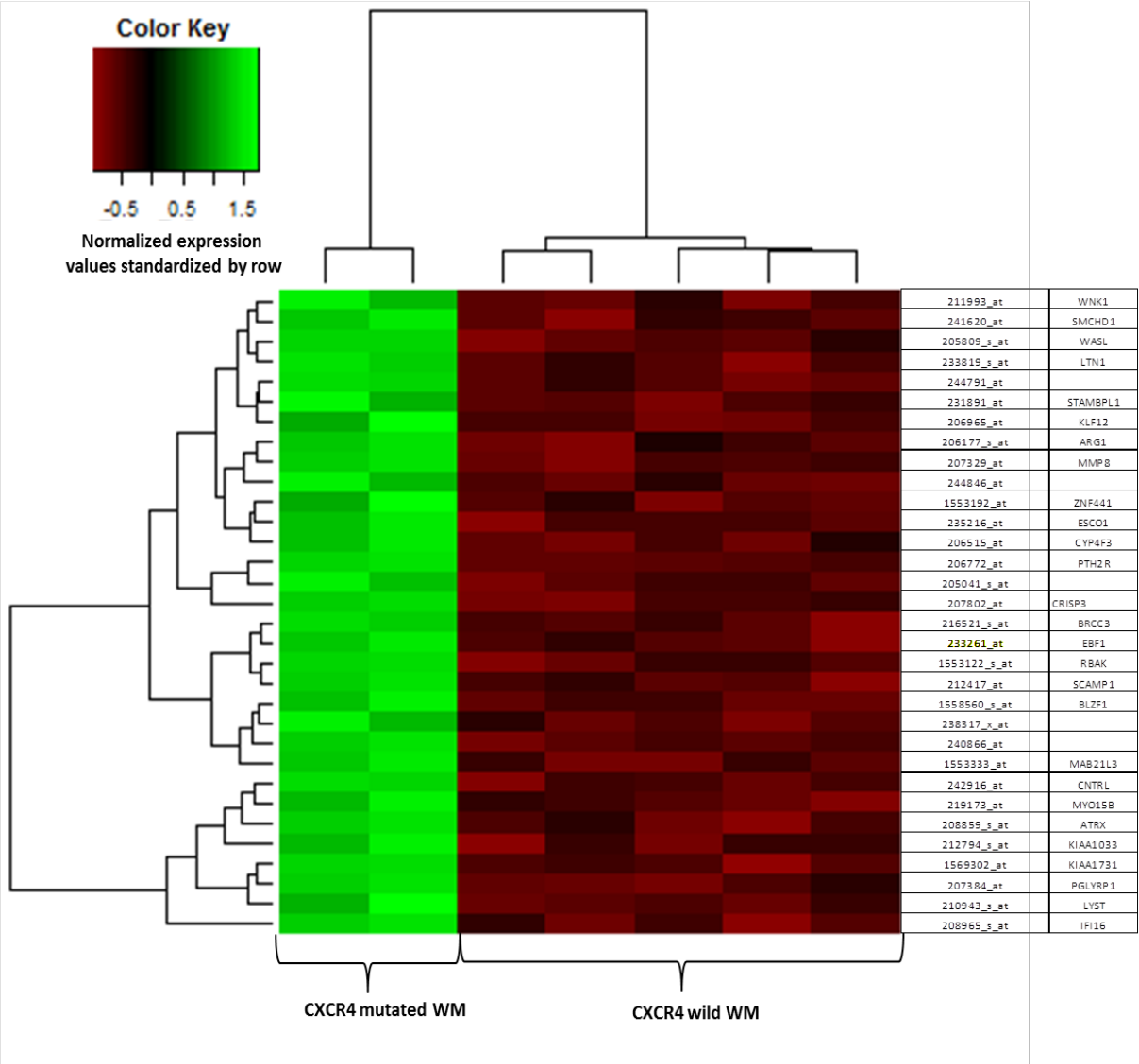
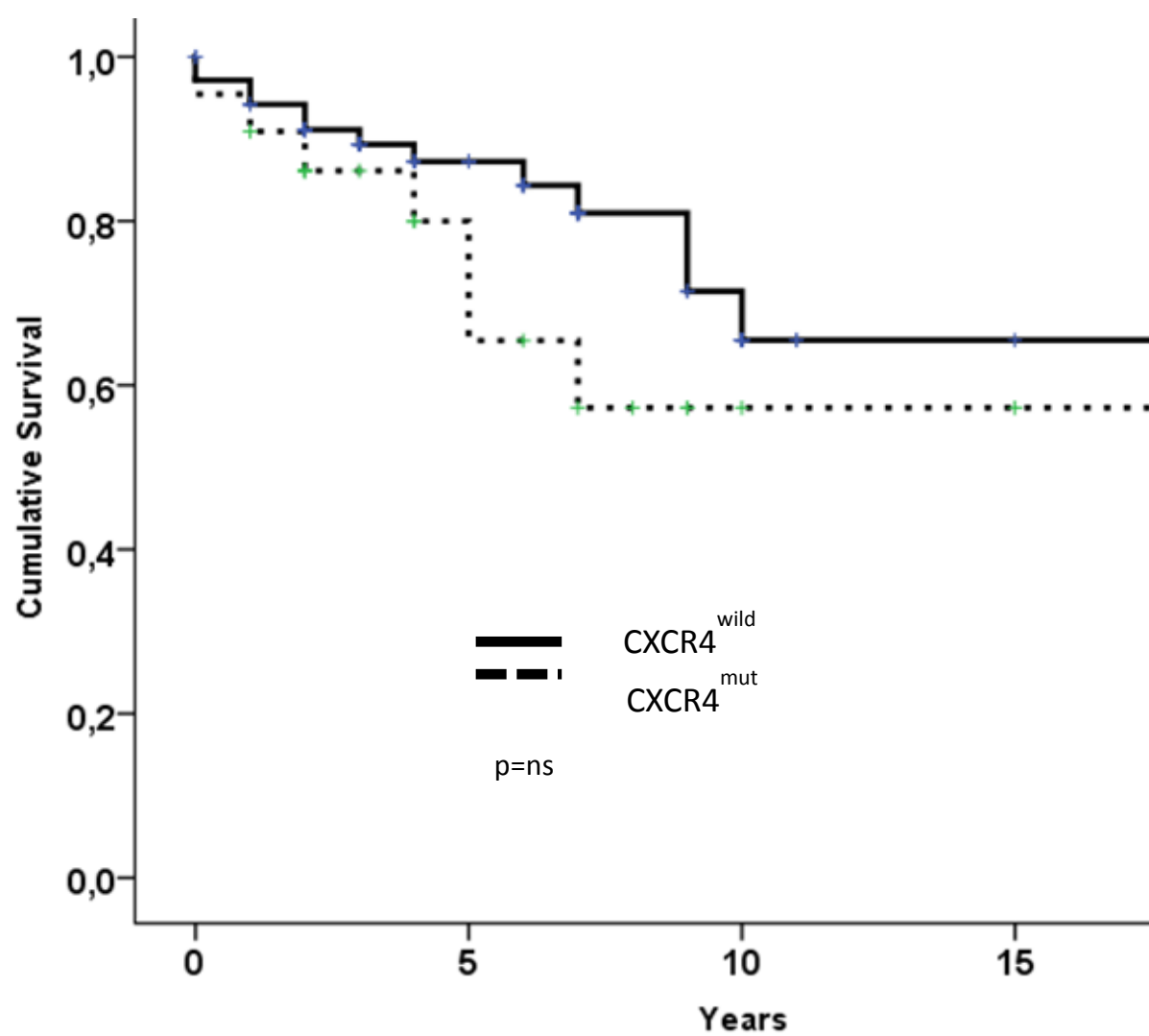


Figure 6



Probe.Set.Identity	Symbol	Gene Name	Cell location	Protein Type(s)	p value
206177_s_at	ARG1	arginase 1	Cytoplasm	enzyme	0.03817
208859_s_at	ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked	Nucleus	transcription regulator	0.04590
1558560_s_at	BLZF1	basic leucine zipper nuclear factor 1	Cytoplasm	transcription regulator	0.03412
216521_s_at	BRCC3	BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3	Nucleus	enzyme	0.03412
242916_at	CNTRL	centriolin	Nucleus	transcription regulator	0.03412
207802_at	CRISP3	cysteine-rich secretory protein 3	Extracellular Space	other	0.03412
206515_at	CYP4F3	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 3	Cytoplasm	enzyme	0.03661
233261_at	EBF1	early B-cell factor 1	Nucleus	transcription regulator	0.03817
235216_at	ESCO1	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1	Nucleus	other	0.03412
208965_s_at	IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	Nucleus	transcription regulator	0.03412
212794_s_at	KIAA1033	KIAA1033	Cytoplasm	other	0.03412
1569302_at	KIAA1731	KIAA1731	Cytoplasm	other	0.03817
206965_at	KLF12	Kruppel-like factor 12	Nucleus	transcription regulator	0.04590
233819_s_at	LTN1	listerin E3 ubiquitin protein ligase 1	Nucleus	enzyme	0.03412
210943_s_at	LYST	lysosomal trafficking regulator	Cytoplasm	transporter	0.03412
1553333_at	MAB21L3	mab-21-like 3 (C. elegans)	Other	other	0.03412
207329_at	MMP8	matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	Extracellular Space	peptidase	0.03412
219173_at	MYO15B	myosin XVB pseudogene	Other	other	0.03817
205041_s_at	ORM1	orosomucoid 1	Extracellular Space	other	0.03412
207384_at	PGLYRP1	peptidoglycan recognition protein 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor	0.04590
206772_at	PTH2R	parathyroid hormone 2 receptor	Plasma Membrane	G-protein coupled receptor	0.00182
1553122_s_at	RBAK	RB-associated KRAB zinc finger	Nucleus	transcription regulator	0.04528
212417_at	SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1	Cytoplasm	transporter	0.04528
241620_at	SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	Nucleus	other	0.03817
231891_at	STAMBPL1	STAM binding protein-like 1	Other	other	0.04528
205809_s_at	WASL	Wiskott-Aldrich syndrome-like	Cytoplasm	other	0.03412
211993_at	WNK1	WNK lysine deficient protein kinase 1	Cytoplasm	kinase	0.04835
1553192_at	ZNF441	zinc finger protein 441	Nucleus	other	0.04528

Supplemental Table 1 : Gene expression profiling : List of deregulated gene identified by gene expression profiling using U133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix, USA). A p value < 0.05 is significant.

Supplemental Table 2 : List of pathways analyzed for GSEA . A p value <0.05 is significant.

Pathways	p value
UP_IN_C1013G_CXCR4_VS_UNMUTATED_Roccaro etal Blood 2014;123:4120-4131	0,11
BIOCARTA_DEAATH_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,41
BIOCARTA_PROTEASOME_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,01
BIOCARTA_BCR_B LYMPHOCYTES_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,04
BIOCARTA_ERK-PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,39
BIOCARTA_AKT-ERK_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,2
BIOCARTA_DEATH_NFKB_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,56
BIOCARTA_DEATH_CELL CYCLE_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,36
BIOCARTA_CXCR4_CYTOKINE_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0,18
WANG_tumor_invasiveness_down	0,3
WANG_tumor_invasiveness_up	0,52
RIZKI_tumor_invasiveness_3d_down	0,09
RIZKI_tumor_invasiveness_3d_UP	0,24
ANTIAPOPTOSIS_Affymetrix	0,87
cellprolifo82831_Affymetrix	0,42
DNAdamage_Affymetrix	0,65
keshavamdr_Affymetrix	0,45
BIOCARTA_AKT_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.36
R4_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.82
BIOCARTA_CELLCYCLE_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.73
BIOCARTA_CYTOKINE_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.09
BIOCARTA_ERK_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.39
BIOCARTA_DEATH_PATHWAY http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards	0.42

	CXCR4^{wild} (n=74)	CXCR4^{mut} (n=24)	p
Sex ratio (M/F)	1.2	1.1	
Age at diagnosis, median [range], years	68	66	ns
ISS-WM stage 3, (%)	26	37	ns
Anemia, median (se), g/dL	11.5 (0.2)	11.4 (0.4)	ns
Hb < 10 g/dl, %	27	32	ns
Thrombopenia, median (se), x10⁹/L	275 (14)	203 (25)	0.021
Platelet count < 100 x10⁹/L, %	6.5	27	0.019
B2 –microglobulin, median, mg/L	3.3	3.6	ns
B2 –microglobulin > 3 mg/l, %	44	46	ns
Monoclonal component, median (se), g/L	18 (0.4)	29 (4.4)	0.028
M-component >30 g/L, %	12	35	0.023
Lymphocytosis, median (se), x10⁹/L	3.5 (0.8)	3.5 (1.3)	ns
Adenopathy, %	20	15	ns
Splenomegaly, %	13	18	ns
Cryoglobulinemia, %	18	10	ns
Cold agglutinin, %	15	10	ns
AIHA, %	5	5	ns
Hyperviscosity, %	4.5	12	ns

Supplemental Table 3. Characteristics of patients with WM according to CXCR4 mutation status

M/F : male/female; Hb : hemoglobin; ISS-WM: International staging system for Waldenström macroglobulinemia; AIHA: Auto Immune Hemolytic Anemia; ns: not significant; se: standard error

IX. ANNEXE 2

Revue Générale publiée dans la collection « FMC » de la revue
Hématologie

Coordonnée par le Pr Véronique Leblond :

« La Leucémie Lymphoïde chronique et la maladie de
Waldenström »

Chapitre : Avancées biologiques dans la maladie de Waldenström
(en cours de publication)

Stéphanie Poulain ^{1,2,3} et Xavier Leleu ^{3,4}

¹ Service d'Hématologie Immunologie Cytogénétique, Centre Hospitalier de Valenciennes, 59322 VALENCIENNES

² Laboratoire d'Hématologie, Centre de Biologie pathologie, CHRU de Lille, 59037 LILLE

³ INSERM UMR-S 1172, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, place Verdun, 59000 LILLE

⁴ Service d'Hématologie et de Thérapie cellulaire, Hôpital de la Milétrie, CHU de Poitiers, 86000 Poitiers

Introduction

La Maladie de Waldenström (MW) est une hémopathie lymphoïde B rare définie par une infiltration de lymphoplasmocytes au niveau médullaire et la présence d'un pic sérique monoclonal de type IgM, initialement classée comme une forme particulière de lymphome lymphoplasmocytaire par l'OMS. De diagnostic parfois délicat de la part la variabilité de sa présentation clinique et biologique, la MW a bénéficié récemment de progrès majeurs dans la compréhension de sa physiopathologie.

Du chromosome au gène : quelles anomalies associées à la MW ?

Les premières analyses cytogénétiques ont été rapportées dans de petites cohortes hétérogènes sur le plan clinique. L'étude de Nguyen-Khac et al . a permis, dans une cohorte de 171 patients, de préciser la fréquence de la plupart des anomalies cytogénétiques récurrentes précédemment décrites en associant la cytogénétique conventionnelle à l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) [1]. La délétion 6q et la trisomie 4 sont observées dans respectivement 30% et 8% des cas. La trisomie 12, les délétions 13q et 11q sont observées dans moins de 15% des cas. La délétion 17p pourrait être un facteur pronostic péjoratif de survie sans événement. L'hybridation génomique comparative sur puces (CGH Arrays) a permis une analyse pangénomique des pertes et des gains de matériel (CNA) de plus haute résolution [2]. De nouveaux mécanismes oncogéniques telles que les pertes d'hétérozygotie sans variation de nombre de copie ou disomies uniparentales acquises ont été détectés par le profilage génomique par SNPa (Single Nucleotide Polymorphism arrays), qui combinent l'allélotypage à la détection des CNA [3,4]. Les MW symptomatiques présentent une fréquence plus élevées d'anomalies [3,4]. D'autre part, des altérations génétiques de régulateurs essentiels de la voie NFκB comme *TRAF3*, *TNFAIP3* ou le *CD79B* ont été ainsi décrites [2,4]. L'analyse des profils d'expression génique a caractérisé une « signature transcriptionnelle » de la MW qui se différencie de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et du myélome multiple [5].

Le séquençage complet du génome de 30 MW, a mis en évidence la présence de la mutation MYD88L265P dans 90 % des cas [6]. D'autres mutations ont été identifiées à plus faible fréquence : *CXCR4*, *CD79B*, *TRAF2*, *TRAF3*, *TNFAIP3*, *HIST1H1E* Les patients avec mutation *ARID1A* (17% des cas) présentent un infiltrat médullaire plus important et des cytopénies plus profondes [6]. La MW constitue donc une entité génomique à part entière au sein des hémopathies lymphoïdes. Le rôle physiopathologique ou pronostique des mutations ou anomalies cytogénétiques additionnelles au sein du clone muté MYD88L265P reste à définir.

MYD88L265P : un outil diagnostic, pronostique et une cible thérapeutique ?

Localisé en 3p22.2, le gène *MYD88* (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) code pour une protéine adaptatrice impliquée dans la réponse de la voie des *Toll like receptor* , de l'IL18 et de IL1 [7,8]. MYD88 participe à l'activation d'une cascade qui fait intervenir le complexe IRAK, TRAF6 et

qui aboutit à l'activation de NFκB. La mutation *MYD88L265P* est située dans l'exon 5 du gène *MYD88* au niveau du domaine TIR qui joue un rôle dans l'homodimérisation et le recrutement d'IRAK1 et IRAK4 [6-8]. Une activation constitutive de BTK, IRAK1/4, TAK1 et de la voie JAK/STAT3 est observée dans des modèles cellulaires de MW *MYD88L265P* [4, 6, 10-12].

La mutation activatrice *MYD88L265P* pourrait être un évènement initiateur dans la MW [12]. Une inhibition pharmacologique de MYD88 conduit à une inhibition de la prolifération, de la viabilité cellulaire et de la voie de signalisation NFκB des cellules *MYD88L265P* [4,6,10]. L'ibrutinib, un inhibiteur de BTK, a montré son efficacité anti tumorale in vitro dans la MW [12]. Le protocole clinique mené par Steven Treon a confirmé l'intérêt de l'ibrutinib en deuxième ligne dans la WM avec une survie globale estimée à 95,2% à 24 mois. Toutefois, l'absence de mutation *MYD88L265P* n'influe pas sur le taux de réponse à l'ibrutinib [6,13]. Le développement d'inhibiteur pharmacologique plus spécifique de MYD88 pourrait être aussi évalué.

Les mutations *CXCR4* : un marqueur de chimiorésistance ?

CXCR4 est un récepteur couplé aux protéines G dont le ligand principal est la chémokine CXCL12. L'axe CXCL12/*CXCR4* joue un rôle essentiel dans le processus de domiciliation cellulaire et de survie cellulaire et est associé à l'activation de différents réseaux de signalisation intracellulaires tels que RAS, Akt et NFκB [14]. Dans la MW, des mutations somatiques de *CXCR4*, localisées dans la partie C terminale du récepteur, sont observées dans environ 25 % des cas principalement dans les MW *MYD88L265P* [15,16]. Ces mutations somatiques, de type non sense ou frame shift, sont comparables à celles initialement décrites dans le syndrome de WHIM (Warts, hypogammaglobulinémie, infections, myelokathesis) et rares dans les autres hémopathies lymphoïdes [17]. La mutation *CXCR4C1013G* est la plus fréquente [16,17]. Sur le plan fonctionnel, une augmentation de la prolifération cellulaire et de la dissémination extramédullaire est observée dans un modèle murin *CXCR4C1013G* [17]. Après stimulation par CXCL12, un défaut d'internalisation du récepteur *CXCR4*, une augmentation de l'activation des voies AKT/ERK et de la survie cellulaire dans les cellules mutées *CXCR4* sont observés [18,19]. La mutation *CXCR4C1013G* a été associée à une résistance à différents agents pharmacologiques tels que l'ibrutinib et les inhibiteurs de Pi3K [17--19]. Les patients mutés *CXCR4* présentent un taux de réponse à l'ibrutinib inférieurs aux patients non mutés [13]. Les mutations de *CXCR4* sont donc des mutations activatrices. Leur impact pronostique clinique pour les nouvelles thérapies ciblées de la MW suggérerait la nécessité d'un pré screening mutationnel pour établir une stratégie thérapeutique personnalisée.

Des critères diagnostic en évolution ?

Le Second International Workshop d'Athènes a introduit la réalisation d'un immunophénotypage des cellules B de la moelle osseuse au panel diagnostic cytologique et histologique de la MW. Toutefois, il

n'existait pas de définition immunophénotypique caractéristique de la MW. L'immunophénotypage par cytométrie en flux multiparamétrique dans une large cohorte de MW a permis récemment de mettre en évidence un profil « typique » de la MW : CD22^{low}/CD23-/CD25+/CD27+/SIgM+ [20]. Ces données restent à confirmer par des études indépendantes. La cytogénétique conventionnelle, qui a bénéficié de l'utilisation des nouveaux stimulants et la FISH, peut être utilisée comme outil de diagnostic différentiel avec d'autres hémopathies lymphoïdes chroniques [1]. En pratique clinique, la recherche de la mutation MYD88L2665P avec une technique sensible (PCR en temps réel,..) est recommandée depuis VIII^{ème} Workshop de Londres en 2014 [13, 21-22]. La mutation *MYD88L265P* peut être toutefois observée à une plus faible fréquence dans d'autres hémopathies lymphoïdes chroniques [6, 9, 21,23]. L'absence de mutation *MYD88L265P* n'exclut pas le diagnostic de MW et définiraient un groupe de MW de pronostic péjoratif [15,16]. Cependant, l'intérêt de *MYD88L265P* comme facteur pronostique ou biomarqueur de la maladie résiduelle en comparaison aux marqueurs classiques de suivi ou en développement (chaines légères libres, cytométrie en flux...) reste à évaluer sur de larges cohortes dans le cadre de protocoles [16,21,22].

Diagnostic différentiel Macroglobulinémie de Waldenström et Lymphome de la zone marginal (MZL) : quoi de neuf ?

Le diagnostic différentiel de ces 2 entités a longtemps été débattu. Sur le plan immunophénotypique, la différence du profil d'expression de l'IgM de surface, du CD25 et de l'intensité du CD22 a été décrite mais demeure délicate à standardiser [20]. La mutation MYD88L265P est observée dans moins de 10% des cas des MZL et est corrélée à l'existence d'un pic IgM [23-25]. Les délétions 7q et les réarrangements IgVH1-2 sont plus fréquents dans le MZL. La trisomie 4 est principalement observée dans les MW qui sont caractérisés par une fréquente utilisation des IgVH3 [1,23]. Le profil mutationnel des MZL est hétérogène et ne permet donc pas distinguer cette entité des MW [6,25]. Une fréquence plus élevée de splénomégalie, de trisomie 3 et expression du CD27 a été identifiée dans ce groupe *MYD* non muté qui pourrait présenter un pic IgM de plus faible intensité [9,16,21]. Une zone grise persiste donc entre ces entités aussi bien sur le plan clinique, biologique et génomique même si l'algorithme diagnostique décisionnel s'est précisé récemment.

La cellule tumorale de WM : quelle origine ?

L'analyse du statut mutationnel des IgVH a montré une hypermutation dans environ 90 % des cas, un biais d'utilisation du répertoire avec une surexpression de la famille Vh3 et un CDR3 court. Le rôle d'une stimulation antigénique dans le processus oncogénique est donc évoqué [24]. L'origine du clone malin de la MW serait une cellule B mémoire IgM⁺ et/ou IgM⁺IgD⁺ bloquée dans son processus de maturation, après l'hypermutation somatique dans le centre germinatif mais avant la différenciation terminale en plasmocyte qui présenterait un déficit dans le processus d'initiation du switch isotypique

[5,8]. Des anomalies dans l'expression de gènes impliqués dans la différenciation terminale des lymphocytes B en plasmocytes comme BACH2 ou dans différentes voies de signalisation telles que PI3K/AKT ou NFκB ont été rapportées par rapport aux cellules B activées CD25⁺/CD22^{low} [3].

IgM : un stade pré Waldenström ?

La présence d'une gammapathie monoclonale de type IgM (MGUS-M) est fréquemment identifiée plusieurs années avant le diagnostic de MW. Un clone B de type MW (CD22^{low}/CD25/CD27⁺/IgM⁺) avec des anomalies génomiques telle que la délétion 6q ou la trisomie 4 peut déjà être observé au stade MGUS-M. Le profil transcriptionnel est comparable à celui des MW [3]. Les mutations *MYD88L265P* et *CXCR4C1013G* sont mises en évidence dans respectivement environ 50% et 20% des MGUS-M [17,21,23]. Le risque d'évolution de la MGUS-M en MW est associé à la présence de la mutation MYD88 et à un pic IgM plus élevé [23]. Ces données indiquent la présence de cellules B aux anomalies immunophénotypiques et génomiques comparables à la MW dès le stade MGUS-M. La question de la redéfinition du diagnostic différentiel MGUS-M/MW, qui repose actuellement sur la mise en évidence d'un infiltrat lymphoïde B de plus de 10% à la BOM est donc posée. Les facteurs impliqués dans la progression clinique de la MM d'une phase asymptomatique MGUS-M/MW à une phase symptomatique MW restent toutefois à déterminer.

En conclusion, la MW a bénéficié d'avancées majeures dans la compréhension de sa physiopathologie, 70 ans après sa première description par Jan Waldenström. La découverte de la mutation *MYD88L265P* a sans nul doute « révolutionné » la MW et ouvre les perspectives de thérapeutiques ciblées. De syndrome clinico biologique rare et mal connu, la MW est devenue aujourd'hui un nouveau modèle d'oncogenèse lymphoïde.

Bibliographie

1. 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*. 2013;98:649-54.
2. Braggio E, Keats JJ, Leleu X, *et al* . Identification of copy number abnormalities and inactivating mutations in two negative regulators of nuclear factor-kappaB signaling pathways in Waldenström's macroglobulinemia. *Cancer Res*. 2009;69:3579-88.
3. Paiva B, Corchete L, Vidriales MB, Garcia-Sanz R, Perez J, Aires-Mejia I, *et al* : The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2015, 125 : 2370
4. Poulain S, Roumier C, Galiegue-Zouitina S, Daudignon A, Herbaux C, Aijjou R, *et al* . Genome wide SNP array identified multiple mechanisms of genetic changes in Waldenström macroglobulinemia. *Am J Hematol* 2013;88:948-54.

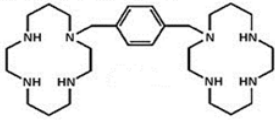
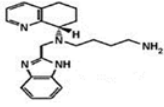
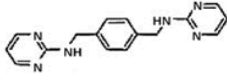
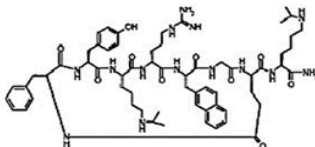
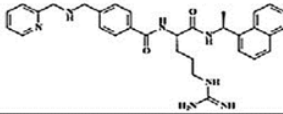
5. Braggio E, Philipsborn C, Novak A, Hodge L, Ansell S, Fonseca R: Molecular pathogenesis of Waldenström's macroglobulinemia? *Haematologica* 2012, 97:1281-90
6. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, *et al* . MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2012,367:826-33.
7. Rossi R: Role of MYD88 in lymphoplasmacytic lymphoma diagnosis and pathogenesis. *Hematology*, 2014, 113-118
8. Janz S. Waldenström macroglobulinemia : Clinical and immunological aspects, natural history, cell origin, and emerging mouse models. *ISRN Hematol* 2013,9;815325
9. Poulain S, Roumier C, Decambron A, Renneville A, Herbaux C, Bertrand E, *et al* . MYD88 L265P mutation in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2013,121:4504-11.
10. Ansell SM, Hodge LS, secreto F, Manske M, Braggio E, Price-Troska T *et al* : Activation of TAK1 by MYD88L265P drives malignant B-cell growth in non-hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J*, 2014bcj.2014.4
11. Wang JQ, Jeelall YS, Beutler B, Horikawa K, Goodnow CC. Consequences of the recurrent MYD88L265P somatic mutation for B cell tolerance. *J Exp Med* 2014;211:413-26.
12. Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, Manning R, Patterson C *et al* : A mutation in MYD88L265P supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2013; 122:1222-32
13. Treon S, Xu L, Hunter Z: MYD88 mutations and response to ibrutinib in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2015, 373[6]:584-6
14. Al Ustwani O, Kurzrock R, Wetzler M. Genetics on a WHIM. *Br J Haematol*. 2014, 164:15-23
15. 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;123:1637-46.
16. 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 Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2014 ; 123:2791-6.
17. 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* 2014,123:4120-31
18. Cao Y, Hunter ZR, Liu X, Xu L, Yang G, Chen J, *et al* . The WHIM-like CXCR4S338X somatic mutation activates AKT and ERK, and promotes resistance to ibrutinib and other agents used in the treatment of Waldenström's Macroglobulinemia. *Leukemia* 2015 ;29: 169-76.
19. Cao Y, Hunter ZR, Liu X, Xu L, Yang G, Chen J, *et al* . CXCR4 WHIM-like frameshift and nonsense mutations promote ibrutinib resistance but do not supplant MYD88L265P -directed survival signalling in Waldenström macroglobulinaemia cells. *Br J Haematol* 2015;168:701-7.

20. Paiva B, Montes MC, Garcia Sanz R, Ocio EM, Alonso J, *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, 28:166-73
21. Jimenez C, Sebastian E, Chillón M, Giraldo P, *et al* : MYD88L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia* 2013,27:1722-28
22. 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;167:506-13.
23. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, Rattoti S *et al* . Prevalence and clinical significance of the MYD88L265P somatic mutation in Waldenström'smacroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood* 2013, 121:2522-8
24. Gachard N, Parrens N, Soubeyran I, Petit B, Marfak A, Rizzo D, Devesa m, Delage-Corre M, Coste V *et al* : IgVH gene features and MYD88L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia*, 2013, 27:183-9
25. Clipson A, Wang M, de Leval L, Ashton-Key M, Wotherspoon A, Vassiliou G *et al* : KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype. *Leukemia* 2015, 29:1177-85

X. ANNEXE 3

Tableau 15 : Antagonistes de CXCR4 en cours d'évaluation clinique (271)

Tableau 15 : Antagonistes de CXCR4 en cours d'évaluation clinique (271)

Name	Company/ university	Description	Amino acid sequences or chemical structures	Indication	Trial number/ reference
AMD3100	Sanofi	Small organic molecule		HSC mobilization in patients with NHL and multiple myeloma; FDA approved Glioma AML Chronic lymphocytic leukemia Myelodysplasia (WHIM syndrome) Ewing sarcoma Neuroblastoma Brain tumors	NCT01339039 NCT01141543 NCT01373229 NCT00967785 NCT01288573
AMD 11070	Genzyme Corp.	Small organic molecule		HIV infections HIV infections/X4 tropic virus HIV infections	NCT00089466 NCT00361101 NCT00063804
MSX122	Emory Univ	Small organic molecule		Refractory metastatic or locally advanced tumors	NCT005911682
CTCE-9908 antagonist	Chemokine Therapeutics Corp.	Peptide CXCL12 mimetic	KGVLSYRKRYLSVSGK	Solid tumors	(62)
CTCE-0214 agonist	Chemokine Therapeutics Corp.	Peptide CXCL12 mimetic	KPVLSYRAPFRFF-Linker-LKWIQEYLEKALN	Mobilization bone marrow recovery	(63)
LY2510924	Lilly	Peptide CXCR4 antagonist		Renal cancer SCLC	NCT01391130 NCT01439568
TG-0054	TaiGen Biotechnology	Small molecule	Heterocyclic (structure not disclosed publicly)	Multiple myeloma NHL Patients with Hodgkin disease and healthy subjects	NCT01018979 NCT01458288 NCT00822341
POL6326	Polyphor Ltd.	Small molecule	Protein epitope mimetics technology	Metastatic breast cancer Hematologic malignancies Multiple myeloma Large reperfused ST-elevation myocardial infarction Healthy volunteers	NCT01837095 NCT01413568 NCT01105403 NCT01905475 NCT01841476
BKT-140 (BL-8040)	Biok.Ther. Ltd. BioLineRx Ltd.	Peptide (T140 analogue)	4F-benzoyl-TN14003	Multiple myeloma CML AML Mobilization of HSCs to peripheral blood	NCT01010880 NCT02115672 NCT01838395 NCT02073019
NOX-A12	NOXXON Pharma AG	Anti-CXCL12	L-enantiomeric RNA oligonucleotide (Spiegelmer)	Autologous stem cell transplantation HSC transplantation Multiple myeloma Chronic lymphocytic leukemia	NCT00976378 NCT01194934 NCT01521533 NCT01486797
BMS-936564 (MDX-1338)	Bristol-Myers Squibb	Anti-CXCR4 antibody	IgG4 antibody	AML Diffuse large B-cell leukemia Chronic lymphocytic leukemia Follicular lymphoma Multiple myeloma	NCT01120457 NCT01359657
ALX-0651	Abylrx	Anti-CXCR4	Nanobody	Healthy volunteers	NCT01374503
KRH-1636	Kureha Chemical Industry	Small organic molecule		Anti-HIV-1 activity	(64)

Abbreviations: CML, chronic myeloid leukemia; SCLC, small cell lung cancer.