



HAL
open science

Caractéristiques biologiques et cliniques de syndromes lymphoprolifératifs chroniques b avec plus d'un clone détectés par cytométrie en flux

Carole Boivert

► **To cite this version:**

Carole Boivert. Caractéristiques biologiques et cliniques de syndromes lymphoprolifératifs chroniques b avec plus d'un clone détectés par cytométrie en flux. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01473197

HAL Id: dumas-01473197

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01473197>

Submitted on 21 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE
Tenant lieu de Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté et soutenu publiquement

Le lundi 30 janvier 2017 à Toulouse

Par

Carole BOIVERT

Née le 28 juin 1989 à Toulouse

**CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES ET CLINIQUES DE
SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS CHRONIQUES B AVEC
PLUS D'UN CLONE DETECTES PAR CYTOMETRIE EN FLUX**

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Michaël PERES

Jury :

Monsieur le Professeur Nicolas SEVENET

Président

Monsieur le Professeur Eric DELABESSE

Assesseur

Monsieur le Professeur Loïc YSEBAERT

Assesseur

Monsieur le Docteur Michaël PERES

Assesseur

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Nicolas SEVENET,
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
UFR des Sciences Pharmaceutiques de Bordeaux
Institut Bergonié

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Loïc YSEBAERT,
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Faculté de médecine de Toulouse

Service d'Hématologie de l'Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse – Oncopole

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être membre de ce jury et d'y apporter votre regard de clinicien. Je vous prie d'accepter mes considérations respectueuses.

A Monsieur le Professeur Eric DELABESSE,
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Faculté de médecine de Toulouse

Chef de service du laboratoire d'Hématologie de l'Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse – Oncopole

Je vous remercie pour la formation que vous m'avez dispensé dans votre laboratoire trois semestres durant. Vous me faites maintenant l'honneur d'accepter de juger mon travail, je vous prie d'accepter l'expression de toute ma considération et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Michaël PERES,
Assistant Hospitalo-Universitaire
UFR de Pharmacie de Toulouse

Laboratoire d'Hématologie de l'Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse – Oncopole

Je te suis très reconnaissante de m'avoir fait confiance et de m'avoir confié de travail. Je te remercie pour tes conseils, pour ta disponibilité et pour tout ce que tu m'as appris.

Je remercie également Naïs PRADE, ingénieur hospitalier au laboratoire d'hématologie de l'IUCT, pour sa grande contribution à ce travail. Merci pour votre disponibilité et pour avoir pris le temps de me monter cette technique.

Merci à tous les biologistes qui m'ont accueillie au cours de ces quatre années d'internat à Bordeaux, Toulouse et Limoges. Je vous remercie pour votre participation immense à ma formation. Merci à tous les techniciens et à toutes les équipes.

A mes parents, merci de m'avoir toujours soutenue et pour les valeurs que vous nous avez transmises.

A Stef, pour notre complicité. Je suis très fière de toi petit frère.

A mes grands-parents maternels et paternels. Merci pour les merveilleux souvenirs d'enfance et pour les moments actuels. Vous êtes un modèle pour nous.

A mes oncles et tantes, à Camille et à tous mes cousins et cousines pour tous les beaux moments passés ensemble.

A mes co-internes pendant tous mes stages, ça a toujours été un plaisir de les passer avec vous,

A Lucie et Pierre-Yves pour votre contribution à ce travail,

A David, Charlotte et Rémi qui m'ont coaché pendant mon premier semestre,

A Sarah et Raphaëlle J et les salons de thé,

Aux mamans Célia et Muriel, à Pierre, Nitesh, Aude, Edouard et Mathilde pour la super ambiance en bactério,

A Julien et JK (les pseudomonas en folie), Claire, Morgane, Youssef pour les repas en musique,

A Thomas, Agnès, Christophe, Laurie, Yannick, Ludo, Raphaëlle B, Meriem et à tous les autres, merci pour votre bonne humeur, vous avez fait passer ces quatre années à une vitesse folle.

A Anne-Laure et Marion, ces années de fac n'auraient pas été les mêmes sans vous. Merci d'avoir toujours été là et pour tous les bons moments passés. J'espère, et je suis sûre, qu'il y en aura encore beaucoup d'autres, même si il faudra prendre l'avion.

A Pierre, pour les Peter Mignonat Before Party, pour les séances révisions à la BU, pour les virées au pays Basque ou au ski et pour ton flex.

A Etienne/super coloc, merci pour ton énergie, ton humour et ta bienveillance.

A Gaëlle et notre super binôme (sauf en chromatogramme solide).

A tous les amis de fac, pour les supers souvenirs,

A Marc (et tes excentricités dirons-nous), Marie Céline, Emilie, Hélène, Leslie, Clara, Cléa, Marie.

A mes amis d'enfance, à Alicia, Audrey, Elodie, Lolote et Martin. Ça a été un plaisir de grandir à vos côtés. Même si nos routes se croisent moins souvent aujourd'hui votre amitié m'est très précieuse.

Le meilleur pour la fin, à Hervé, parce que la vie est douce à tes côtés. Merci pour les bons moments, passés et à venir.

A Jo

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	2
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES ANNEXES.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION.....	12
1. PHYSIOLOGIE DE LA DIFFERENCIATION LYMPHOCYTAIRE B ET DES REMANIEMENTS DES GENES DES IMMUNOGLOBULINES	13
1.1. Développement des lymphocytes B	13
1.1.1. Différenciation médullaire des lymphocytes B (d'après)	13
1.1.2. Différenciation post-médullaire des lymphocytes B	14
1.2. Les immunoglobulines humaines	15
1.2.1. Généralités et structure	15
1.2.2. Organisation des gènes d'immunoglobulines humaines	16
1.3. Génération de la diversité des immunoglobulines	17
1.3.1. Réarrangement des gènes des immunoglobulines.....	17
1.3.2. Hypermutation somatique	19
1.3.3. Commutation isotypique ou switch de classe	19
1.4. La différenciation lymphocytaire : un terrain favorable à la lymphomagenèse B	20
2. LES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS CHRONIQUES B (SLPC B) MATURES	23
2.1. Epidémiologie.....	23
2.2. Facteurs de risque	26
2.3. Clinique	26
2.4. Diagnostic	27
2.4.1. Examen anatomo-pathologique.....	27
2.4.2. Immunophénotypage.....	28
2.4.3. Biologie moléculaire et cytogénétique	37

2.5.	Bilan d'extension des LNH	38
2.6.	Classifications des LNH	39
2.6.1.	Classification d'Ann Arbor	39
2.6.2.	Classification de Binet	39
2.6.3.	Index pronostiques	40
2.7.	Bilan pré thérapeutique des LNH.....	40
2.8.	Stratégies thérapeutiques des LNH.....	41
2.8.1.	Lymphomes non hodgkiniens agressifs.....	41
2.8.2.	Lymphomes non hodgkiniens indolents.....	42
2.9.	Les lymphomes composites	43
3.	ETUDE.....	45
3.1.	Patients et prélèvements	45
3.2.	Analyse par cytométrie en flux	46
3.2.1.	Marquage des sous populations lymphocytaires	46
3.2.2.	Marquage des lymphocytes B	46
3.3.	Analyse du caryotype et analyse par FISH.....	47
3.3.1.	Réalisation du caryotype	47
3.3.2.	Réalisation de l'analyse par FISH	47
3.4.	Séquençage nouvelle génération (NGS) du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines.....	48
3.4.1.	Préparation de la librairie de séquençage	48
3.4.2.	Analyse des résultats de séquençage	49
3.5.	Résultats	50
3.5.1.	Patients	50
3.5.2.	Immunophénotypage.....	50
3.5.3.	Données biologiques et cliniques	55
3.5.4.	Caryotype et FISH.....	57
3.5.5.	NGS	59
3.5.6.	Stratégie thérapeutique	62
3.6.	Discussion.....	64
	CONCLUSION	70

BIBLIOGRAPHIE.....71
ANNEXES.....75

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURE 1 : STRUCTURE DE BASE DES IMMUNOGLOBULINES	16
FIGURE 2 : GENERATION DES RECEPTEURS LYMPHOCYTAIRES D'ANTIGENES : REARRANGEMENT DES GENES DES IMMUNOGLOBULINES.....	18
FIGURE 3 : SWITCH DE CLASSE	20
FIGURE 4 : ONTOGENIE DES LYMPHOCYTES ET HEMOPATHIES MALIGNES LYMPHOÏDES B	21
FIGURE 5 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE L'ANALYSEUR-TRIEUR	29
FIGURE 6 : HISTOGRAMME CD45/SSC	31
FIGURE 7 : APPLICATION DU SCORE AUX SLPC B MATURES	35
FIGURE 8 : PREPARATION D'UN SEGMENT D'INTERET POUR LA LIBRAIRIE DE SEQUENÇAGE.....	48
FIGURE 9 : DIAGRAMME DES ASSOCIATIONS LYMPHOMATEUSES RENCONTREES.....	53
TABLEAU 1 : 2016 WHO CLASSIFICATION OF MATURE LYMPHOID, HISTIOCYTIC, AND DENDRITIC NEOPLASMS	24
TABLEAU 2: NOMBRE DE CAS INCIDENTS ESTIMES EN FRANCE EN 2012, MEDIANE D'AGE, TAUX D'INCIDENCE BRUT ET STANDARDISE MONDE EN 2012, PAR SEXE ET PAR TYPE D'HEMOPATHIE MALIGNE.....	25
TABLEAU 3: ANTIGENES D'INTERET DANS LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS CHRONIQUES B.....	30
TABLEAU 4 :APPROCHE PAR CYTOMETRIE EN FLUX POUR LE DIAGNOSTIC ET LA CLASSIFICATION DES SLPC B MATURES.....	33
TABLEAU 5 : CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS CHRONIQUES B	37
TABLEAU 6 : PROFILS IMMUNOPHENOTYPIQUES.....	52
TABLEAU 7 : RATIO KAPPA / LAMBDA.....	54
TABLEAU 8 : TABLEAU RECAPITULATIF DES CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES DES PATIENTS PRESENTANT AU MOINS UN CLONE DE LLC ET COMPARAISON A LA LITTERATURE	57
TABLEAU 9 : CLASSIFICATION DES PATIENTS SELON LES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES.....	58
TABLEAU 10 : RECHERCHE DE DELETION DES GENES <i>ATM</i> ET <i>TP53</i>	59
TABLEAU 11 : REARRANGEMENTS RETROUVES EN NGS : POURCENTAGE, PRODUCTIVITE, STATUT MUTATIONNEL ET COMPARAISON AUX RESULTATS DE L'IMMUNOPHENOTYPAGE	60

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA CYTOMETRIE EN FLUX	76
ANNEXE 2 : PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'ANALYSE CYTOGENETIQUE.....	77
ANNEXE 3 : PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE (FISH).....	79
ANNEXE 4 : SONDES UTILISEES POUR L'HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE (FISH)	80
ANNEXE 5 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN	82
ANNEXE 6 : PROTOCOLE PCR1 MULTIPLEX FR2	83
ANNEXE 7 : PROTOCOLE POST-PCR1.....	84
ANNEXE 8 : QUANTIFICATION DE LA LIBRAIRIE	85
ANNEXE 9 : AMORCES UTILISEES POUR LE NGS.....	86
ANNEXE 10 : EXEMPLE DE PROFIL NGS.....	87
ANNEXE 11 : PARAMETRES CLINICO-BIOLOGIQUES ET TRAITEMENTS.....	86
ANNEXE 12 : CARYOTYPE	90

LISTE DES ABREVIATIONS

2-CDA : 2-chlorodéoxyadénosine	GC : Centre germinatif
ACVBP : Cyclophosphamide, adriblastine, vindesine, bleomycine, prednisone	IGH : Locus du gène des chaînes lourdes
ADN : Acide désoxyribonucléique	IL-7 : Interleukine 7
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	IPI : Index pronostique international
AID : Activation-Induced cytidine Deaminase	LAL : Leucémie aigüe lymphoïde
ALAT : Alanine amino transférase	LBDGC : Lymphome B diffus à grandes cellules
ARN : Acide ribonucléique	LDH : Lactate Déshydrogénase
ASAT : Aspartate amino transférase	LF : Lymphome folliculaire
ATM : Ataxia telangiectasia mutated	LGL : Grand lymphocyte à grains
BCR : Récepteur des cellules B	LLC : Leucémie lymphoïde chronique
BendaEAM : Bendamustine, etoposide, aracytine et melphalan	LM : Lymphome du manteau
CD : Cluster de différenciation	LNH : Lymphome non hodgkinien
CDR : Complementarity determining regions	LZM : Lymphome de la zone marginale
CHOP : Cyclophosphamide, adriamycine, vincristine et prednisone	MALT : Tissu lymphoïde associé aux muqueuses
CMF : Cytométrie en flux	MBL : Lymphocytose B monoclonale
CRP : Protéine C réactive	MGUS : Gammapathie monoclonale de signification indéterminée
CVP : Cyclophosphamide, vincristine (dose réduite), prednisone	MM : Myélome multiple
DFG : Débit de Filtration Glomérulaire	MW : Maladie de Waldenström
DHAC : Dexaméthasone, cytarabine et carboplatine	NGS : Séquençage nouvelle génération
ECG : Electrocardiographie	OMS : Organisation mondiale de la santé
EFR : Exploration fonctionnelle respiratoire	ORL : Oto-rhino-laryngologie
FDG : Fluorodésoxyglucose	PAL : Phosphatases alcalines
FLIPI : Index pronostique international des lymphomes folliculaires	PCR : Réaction en chaîne par polymérase
FLT3 : Fms-like Tyrosine kinase 3	PDB : Paires de bases
FR : Framework	R-Bendamustine : Rituximab et bendamustine
	R-CD : Rituximab, cyclophosphamide et dexaméthasone
	R-Chloraminophène : Rituximab et chloraminophène
	R-CHOP : Rituximab - CHOP
	R-CVP : Rituximab - CVP

R-DHAOx : Rituximab, dexaméthasone, cytarabine et oxaliplatine

R-FC : Rituximab, fludarabine et cyclophosphamide

RAG : Protéine activant la recombinaison

SLL : Small lymphocytic leukemia

SLPC : Syndrome lymphoprolifératif chronique

SNC : Système nerveux central

TDM : Tomodensitométrie

TdT : Terminal deoxynucleotidyl transferase

TEP : Tomographie par émission de positrons

TGO : Glutamo oxaloacétate transférase

TGP : Glutamate pyruvate transaminase

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VS : Vitesse de sédimentation

INTRODUCTION

Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B sont diagnostiqués chez 20 000 nouveaux patients par an en France. On en dénombre une cinquantaine qui sont caractérisés par une grande hétérogénéité aussi bien du point de vue clinique, pronostique, thérapeutique que du type de cellule maligne à l'origine de la maladie. Ces syndromes sont cependant bien caractérisés et font l'objet de prises en charge, guidées par des référentiels, en milieu spécialisé.

Depuis plusieurs années, suite à une recherche de clonalité B effectuée au laboratoire, des patients présentant plus d'un clone B à l'immunophénotypage ont été observés.

Plusieurs articles scientifiques ont été publiés au sujet des lymphomes composites ou de l'association de plusieurs clones à l'immunophénotypage. Cependant nos connaissances de ce phénomène restent incomplètes.

Nous avons décidé d'approfondir l'étude de ce type de prolifération au sein de la population de patients diagnostiqués au laboratoire d'hématologie du CHU de Toulouse.

L'objectif de ce travail est de définir l'incidence des syndromes lymphoprolifératifs avec plus d'un clone sur la population de patients analysés dans le laboratoire de cytométrie en flux, de décrire les caractéristiques cliniques et biologiques de ces patients et d'étudier la prise en charge thérapeutique qui a été initiée.

Dans un même temps nous avons réalisé un séquençage du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines chez certains patients. Nous avons voulu vérifier si la technique NGS pouvait permettre de confirmer la présence de plusieurs clones sans nécessité de trier les populations clonales au préalable et d'identifier éventuellement un clone ayant évolué en plusieurs sous-clones mais exprimant différemment certains marqueurs en CMF.

1. PHYSIOLOGIE DE LA DIFFERENCIATION LYMPHOCYTAIRE B ET DES REMANIEMENTS DES GENES DES IMMUNOGLOBULINES

1.1. Développement des lymphocytes B

1.1.1. Différenciation médullaire des lymphocytes B (d'après ¹)

Les cellules B, les cellules T et les cellules NK appartiennent à la lignée lymphoïde, elles sont issues d'un progéniteur lymphoïde commun (CLP), qui est lui-même issu d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) pluripotente. Les CSH donnent également naissance à toutes les autres cellules sanguines circulantes.

L'interaction entre une CSH et les cellules stromales est nécessaire au développement des cellules B. La liaison du récepteur à activité tyrosine kinase FLT3 à son ligand (FLT3L), présent sur les cellules stromales, va entraîner la différenciation de la CSH en progéniteur lymphoïde commun. A ce stade, le récepteur de l'interleukine-7 (IL-7) apparaît sur le CLP. L'IL-7 produite par les cellules stromales est indispensable pour le développement de la lignée lymphoïde B.

Le progéniteur lymphoïde commun donne naissance à la cellule la plus précoce de la lignée B, la cellule pré-pro-B. Cette dernière se différencie alors en cellule pro-B dans laquelle le réarrangement des gènes d'immunoglobulines commence. Un seul locus est réarrangé à la fois, selon une séquence fixe. Le locus de la chaîne lourde est réarrangé en premier. Une première recombinaison est tentée sur l'un des deux chromosomes 14 pris au hasard pour la chaîne lourde au stade pro-B. Si la recombinaison est réussie, c'est-à-dire si une chaîne lourde peut être synthétisée alors le réarrangement est productif. Le second chromosome ne sera alors pas recombiné et ne sera pas exprimé. Si au contraire la tentative est un échec, une nouvelle recombinaison est tentée sur le deuxième chromosome 14. De ce mécanisme de recombinaison découle le phénomène d'exclusion allélique.

L'expression fonctionnelle d'une chaîne lourde permet la formation du pré-BCR et le passage de la cellule au stade pré-B. A ce stade a lieu le réarrangement des gènes de la chaîne légère. La toute première tentative de recombinaison pour les chaînes légères s'effectue au niveau de l'un des deux gènes κ . En cas d'échec il est fait appel au gène κ de l'autre chromosome 2 et aux gènes λ du chromosome 22 si le réarrangement des 2 gènes κ a échoué. Une même cellule n'exprime ainsi jamais à la fois une chaîne κ et une chaîne λ , c'est l'exclusion isotypique.

Si tous les réarrangements possibles échouent à un moment donné, le précurseur lymphoïde B ne produira pas d'immunoglobuline, son développement sera stoppé et il rentrera en apoptose.

Les cellules exprimant une immunoglobuline fonctionnelle sous la forme d'une IgM de surface sont alors classées comme cellules B immatures. Elles subissent une étape de sélection négative visant à éliminer les cellules exprimant un BCR potentiellement auto-réactif.

Une fois cette sélection effectuée, les cellules B quittent la moelle osseuse pour se rendre dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires : ganglions lymphatiques, rate, MALT...

Le facteur de transcription Pax5 est indispensable à l'engagement du progéniteur lymphoïde vers la lignée B. Il va permettre l'activation de gènes spécifiques qui vont induire la recombinaison VDJ, faciliter la signalisation du pré-BCR et conduire au développement des lymphocytes B matures. ² Des anomalies de Pax5 sont impliquées dans certaines hémopathies B, ses mutations sont ainsi fréquemment retrouvées dans des leucémies aiguës lymphoïdes (LAL). ³

1.1.2. Différenciation post-médullaire des lymphocytes B

Les cellules B immatures qui ont quitté la moelle osseuse passent par un stade intermédiaire, le stade B transitionnel. La sélection périphérique a lieu à ce stade.

Les lymphocytes B qui survivent à la sélection périphérique expriment une IgM et/ou une IgD de surface. Ils vont se différencier, soit en lymphocytes B folliculaires conventionnels et permettre les réponses humorales dépendantes des lymphocytes T, soit en lymphocytes B de la zone marginale qui sont impliqués dans les réponses humorales thymo-indépendantes.

Les lymphocytes B folliculaires représentent 80% des cellules B de la rate à l'âge adulte et possèdent la capacité de coloniser les ganglions lymphatiques. Après activation par leur rencontre avec l'antigène, les lymphocytes B peuvent, soit se différencier rapidement en plasmocytes à IgM à courte durée de vie, soit former des centres germinatifs où ils subissent les processus d'hypermutation somatique et de commutation isotypique, avant de se différencier en cellules B mémoires ou en plasmocytes à longue durée de vie.

Les cellules B mémoires constituent un groupe minoritaire de cellules à longue durée de vie, capables de persister à l'état quiescent sans proliférer (de plusieurs mois à plusieurs dizaines d'années chez l'homme). Elles n'expriment en général plus d'IgD, ont commuté (expriment un autre isotype), et peuvent avoir des localisations préférentielles telles que les muqueuses pour les cellules ayant commuté pour produire des IgA. Les cellules mémoires ont la faculté de répondre rapidement à des pathogènes. En effet, elles peuvent présenter

rapidement et efficacement l'antigène aux lymphocytes T lors d'une réponse secondaire et se différencier plus rapidement en plasmocytes.

Les plasmocytes sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire humorale par sécrétion d'anticorps. Ils sont retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions et tissu lymphoïde annexé au tissu digestif) et dans la moelle osseuse. Ils ne sont habituellement pas retrouvés dans le sang (sauf circonstances pathologiques).

L'origine des lymphocytes B de la zone marginale qui sont impliqués dans les réponses thymo-indépendante est mal connue. Néanmoins, ils constituent la première ligne de défense contre certains micro-organismes comme les bactéries encapsulées. ⁴

1.2. Les immunoglobulines humaines

1.2.1. Généralités et structure

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines exprimées à la surface des cellules B, où elles jouent le rôle de récepteur spécifique d'antigènes, ou circulant sous forme soluble dans le sang ou la lymphe.

Chaque immunoglobuline présente une dualité fonctionnelle : une région de la molécule lie l'antigène, tandis qu'une autre assure les fonctions dites effectrices (fixation à des tissus de l'hôte, à diverses cellules du système immunitaire...). ⁵

Toutes les immunoglobulines sont formées d'une structure commune comprenant quatre chaînes polypeptidiques, composées de deux chaînes légères (L ; Light) identiques (23kD) et deux chaînes lourdes (H ; Heavy) identiques (50-70kD). ⁶

Les chaînes lourdes et légères et les deux chaînes lourdes sont maintenues ensemble par des ponts disulfures inter-chaînes ainsi que des liaisons non covalentes.

Les chaînes peuvent être divisées en deux types de régions basées sur la variabilité des séquences :

- pour la chaîne légère : les régions variable V_L (110 acides aminés) et constante C_L (110 acides aminés).
- pour la chaîne lourde : les régions variable V_H (110 acides aminés) et constantes C_H (330-440 acides aminés).

La région variable est composée d'une alternance de régions peu variables (régions FR dites de charpente ou Framework) et de parties hypervariables (CDR ou complementary determining region).⁷

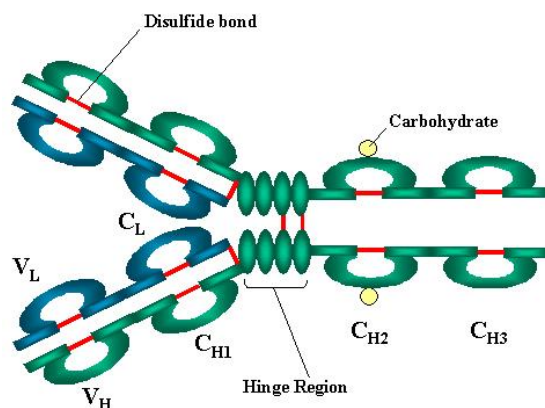


Figure 1 : Structure de base des immunoglobulines

source : d'après <http://www.microbiologybook.org/French-immuno/immchapter4.htm> (dernière mise à jour 25/10/2015)

Il existe différents types de chaînes lourdes, gamma, alpha, mu, delta et epsilon, qui déterminent 5 classes d'immunoglobulines, respectivement, IgG, IgA, IgM, IgD, et IgE. Certaines classes d'Ig sont également divisées en sous classes (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2). Il n'y a pas de sous classe d'Ig pour les IgM, les IgD et les IgE. Il existe seulement deux types de chaînes légères : kappa ou lambda.

1.2.2. Organisation des gènes d'immunoglobulines humaines

Le locus des gènes des chaînes lourdes (*IGH*) est situé sur le chromosome 14. Il comprend environ 70 segments regroupés en trois familles de gènes dits de variabilité (V), de diversité (D) et de jonction (J). Neuf gènes codent les régions constantes (C) des 9 sous-classes d'immunoglobulines.

Il y a deux *loci* pour les gènes des chaînes légères. Les gènes des chaînes légères κ sont situés sur le chromosome 2. Ils comportent 31 à 35 segments V κ fonctionnels ainsi que 5 segments J κ qui codent la partie variable de la chaîne légère. Un seul segment C κ code pour la partie constante.

Les gènes des chaînes légères λ sont situés sur le chromosome 22. Ils comportent environ 30 segments V λ ainsi que 4 segments J λ . Il existe au moins 6 gènes C λ différents.

Il n'y a pas de segment D dans la partie variable des gènes des chaînes légères kappa ou lambda.

1.3. Génération de la diversité des immunoglobulines

Les organismes supérieurs ont élaboré des mécanismes génétiques et moléculaires particuliers qui permettent la génération d'anticorps de haute affinité et de grande spécificité afin de lutter contre un nombre théoriquement infini d'antigènes.

1.3.1. Réarrangement des gènes des immunoglobulines

En réalité, seuls les gènes codant pour les parties variables des Ig sont réarrangés. Ces réarrangements ont lieu aux différents stades du développement des précurseurs B. Les régions variables des chaînes lourdes sont obtenues par l'association, dans un premier temps, d'un segment de jonction J_H avec un segment de diversité D_H , puis le réarrangement de cette association $D-J_H$ avec un segment variable V_H , le tout aboutissant à la formation d'un exon VDJ .

Lorsque le réarrangement productif d'une chaîne lourde est effectif, le même scénario se reproduit avec les chromosomes codant pour les chaînes légères. Les régions variables des chaînes légères sont générées seulement par jonction de segments V_L et J_L pour former un exon VJ .

Les régions d'ADN comprises entre les différents segments sont délétées lors de ces réarrangements sous forme d'un ADN circulaire ou épisome. Les segments géniques codant les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères ainsi qu'une séquence signal (L, Leader) sont ensuite associés aux exons codant la région constante des chaînes correspondantes. Après épissage, les ARN messagers matures sont prêts à être traduits en protéines. Le passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des immunoglobulines s'effectue par épissage alternatif d'un même transcrit primaire de chaîne lourde.⁸

La ligation des gènes V, (D) et J est assurée par des enzymes spécifiques, les recombinases. Les recombinases RAG-1 et RAG-2 sont les seules enzymes lymphoïdes nécessaires à la recombinaison $V(D)J$. L'expression des gènes RAG-1 et RAG-2 est strictement contrôlée lors du développement lymphocytaire B permettant les réarrangements d'abord au niveau du locus *IGH*, puis au niveau des gènes des chaînes légères.

Le choix des segments constituant les régions variables au cours du réarrangement des gènes des immunoglobulines est gouverné par le hasard. Le grand nombre de segments V, D et J disponibles et les multiples combinaisons possibles entre ces éléments constituent la base de ce qui est appelé la diversité combinatoire.

La diversité jonctionnelle permet d'augmenter encore la diversité créée par les mécanismes de recombinaison. Lors des processus de recombinaison $V(D)J$, les mécanismes de réparation de l'ADN créent une variabilité dans les zones de jonction entre les gènes

associés et la position précise à laquelle les segments génétiques V(D)J se joignent peut légèrement varier.

A la jonction entre les segments D et J on retrouve souvent une insertion de quelques nucléotides, catalysée par une enzyme appelée TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase). Cette enzyme catalyse la polymérisation au hasard de nucléotides dans l'ADN sans nécessité de matrice. Cela conduit à encore davantage de diversité.

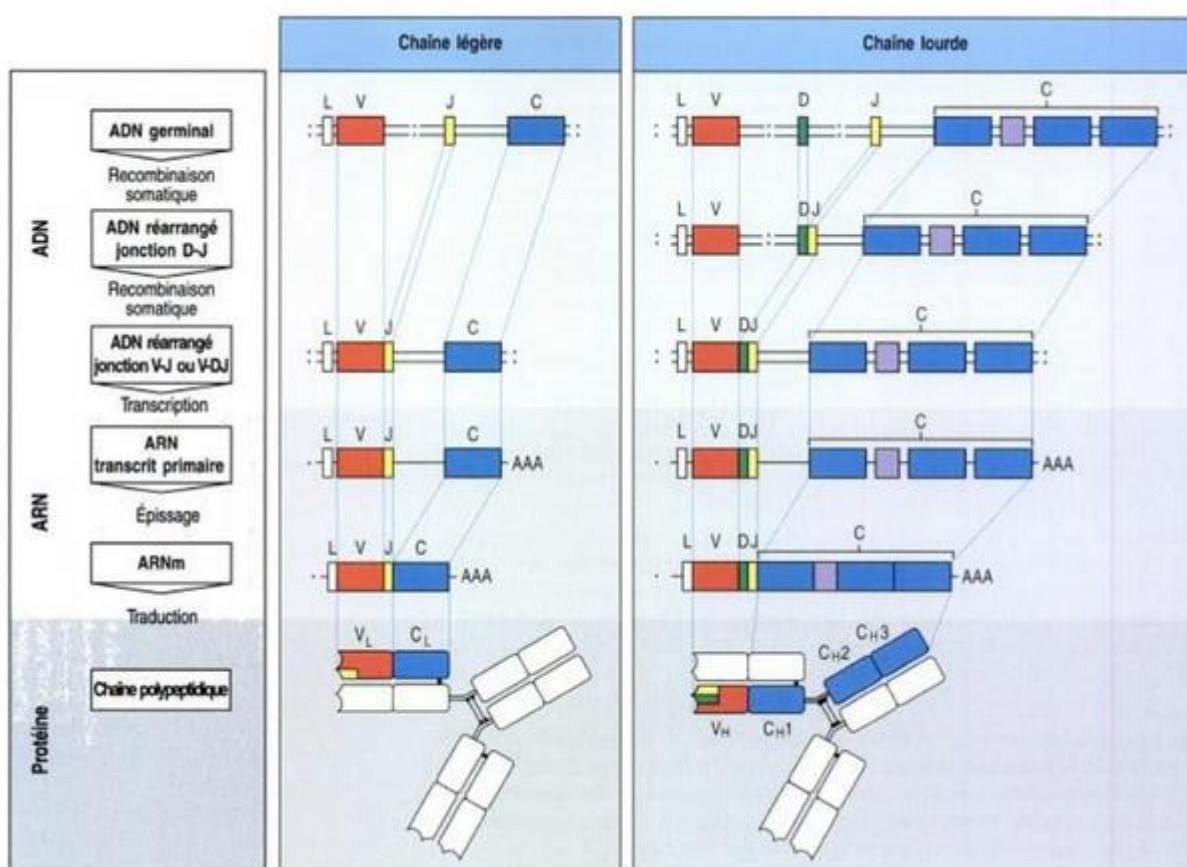


Figure 2 : Génération des récepteurs lymphocytaires d'antigènes : réarrangement des gènes des immunoglobulines

source : Charles A. Janeway et al., Immunobiologie (De Boeck Supérieur, 2009).

1.3.2. Hypermutation somatique

Malgré sa diversité, le répertoire primaire des régions variables des immunoglobulines, créé par le réarrangement V(D)J a une faible affinité pour l'antigène.

La maturation des lymphocytes B lors de la réponse aux antigènes dépendants des lymphocytes T est marquée par une diversification de ce répertoire par l'introduction de mutations ponctuelles au sein des gènes codant pour les régions variables des immunoglobulines déjà réarrangées, plus rarement par des insertions ou des délétions nucléotidiques. Ce phénomène qui a lieu dans la zone sombre des centres germinatifs permet de moduler et donc, dans certains cas, d'augmenter l'affinité des immunoglobulines. Les lymphocytes B qui expriment des immunoglobulines de haute affinité sont sélectionnés par l'antigène au niveau de la zone claire du centre germinatif, prolifèrent, se différencient en cellules sécrétrices d'anticorps et dominent la réponse secondaire.

Ainsi, l'expression de gènes variables mutés est la caractéristique des lymphocytes des centres germinatifs et des cellules qui en dérivent.

L'AID (Activation-Induced cytidine Deaminase), une enzyme exclusivement exprimée dans les centres germinatifs *in vivo*, est responsable de ces hypermutations somatiques.⁹

1.3.3. Commutation isotypique ou switch de classe

La spécificité antigénique des immunoglobulines est déterminée par les régions variables des chaînes lourdes et légères. Les fonctions effectrices, en revanche, dépendent des régions constantes (C) des chaînes lourdes et varient selon les isotypes. Les IgM sont majoritairement produites au cours de la réponse primaire, alors que les IgG, IgA ou IgE sont majoritairement produites au cours d'une réponse secondaire ou tertiaire. Au cours de la commutation isotypique ou switch de classe, le gène réarrangé VDJ se rapproche d'un nouveau segment constant codant pour les domaines constants d'une classe d'immunoglobulines différente par un processus de recombinaison somatique. Les lymphocytes B matures peuvent alors exprimer et sécréter une des classes d'immunoglobulines (IgG, IgA ou IgE) spécifiques de l'antigène. Ce processus est primordial pour la diversité fonctionnelle des réponses anticorps. La commutation de classe est un mécanisme complexe et hautement régulé. Il cible des "points chauds" de recombinaisons appelés régions «switch» ou S, situées en amont de tous les domaines constants à l'exception de C δ . Les régions «switch» sont des sites de recombinaison de longueur variable. L'AID est également indispensable pour cette étape.¹⁰

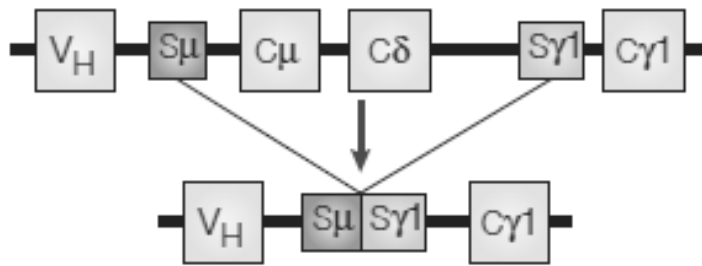


Figure 3 : Switch de classe

Sur cette figure les régions constantes d'une IgM (C_μ) et d'une IgD (C_δ) sont échangées contre la région constante d'une IgG ($C_\gamma1$) par recombinaison des régions « switch » S_μ et $S_\gamma1$

source : Ralf Küppers, "Mechanisms of B-cell Lymphoma Pathogenesis," *Nature Reviews Cancer* 5, no. 4 (April 2005): 251–262

1.4. La différenciation lymphocytaire : un terrain favorable à la lymphomagenèse B

Chaque lymphome B a une origine qui peut-être précisément localisée à un stade de la différenciation B. En revanche la leucémie lymphoïde chronique (LLC) peut trouver son origine avant le centre germinatif ou dans le centre germinatif après la rencontre avec l'antigène.

La classification actuelle des lymphomes définie par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) consiste en un recensement d'entités qui doivent faire référence à la contrepartie normale chaque fois que cela est possible.

Parmi l'ensemble des lymphomes B recensés dans la classification OMS, seuls les lymphomes lymphoblastiques, les lymphomes du manteau et un sous-groupe de LLC B ont pour équivalent non tumoral un lymphocyte B pré-centre germinatif (pré-GC) (absence de mutations somatiques des gènes des immunoglobulines).

Le lymphome folliculaire est reconnu comme dérivant d'un lymphocyte B du centre germinatif (GC) tant du point de vue morphologique qu'immunophénotypique.

Le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) se rattache également aux lymphocytes B du centre germinatif.

Le lymphome de Burkitt dérive d'un centroblaste, cellule B proliférant à très haute vitesse.

L'entité LLC B constitue un ensemble hétérogène recouvrant au moins deux sous-groupes. Les travaux de Hamblin *et al.* montrent que les mutations somatiques des gènes des immunoglobulines sont retrouvées dans 50 % des LLC B. ¹¹ Les LLC dont les gènes des

immunoglobulines ne sont pas mutés dériveraient d'un lymphocyte B naïf pré-GC alors que les LLC dont les gènes sont mutés ont une origine post-GC.

La leucémie à polylmphocytes semble en revanche d'origine post-GC.

L'équivalent physiologique du lymphome de la zone marginale serait la cellule B de la zone marginale du ganglion à un stade post-GC.

Concernant les lymphomes lymphoplasmocytaires, auxquels est rattachée la maladie de Waldenström l'analyse des séquences VDJ indique une origine post-germinale constante. ¹²

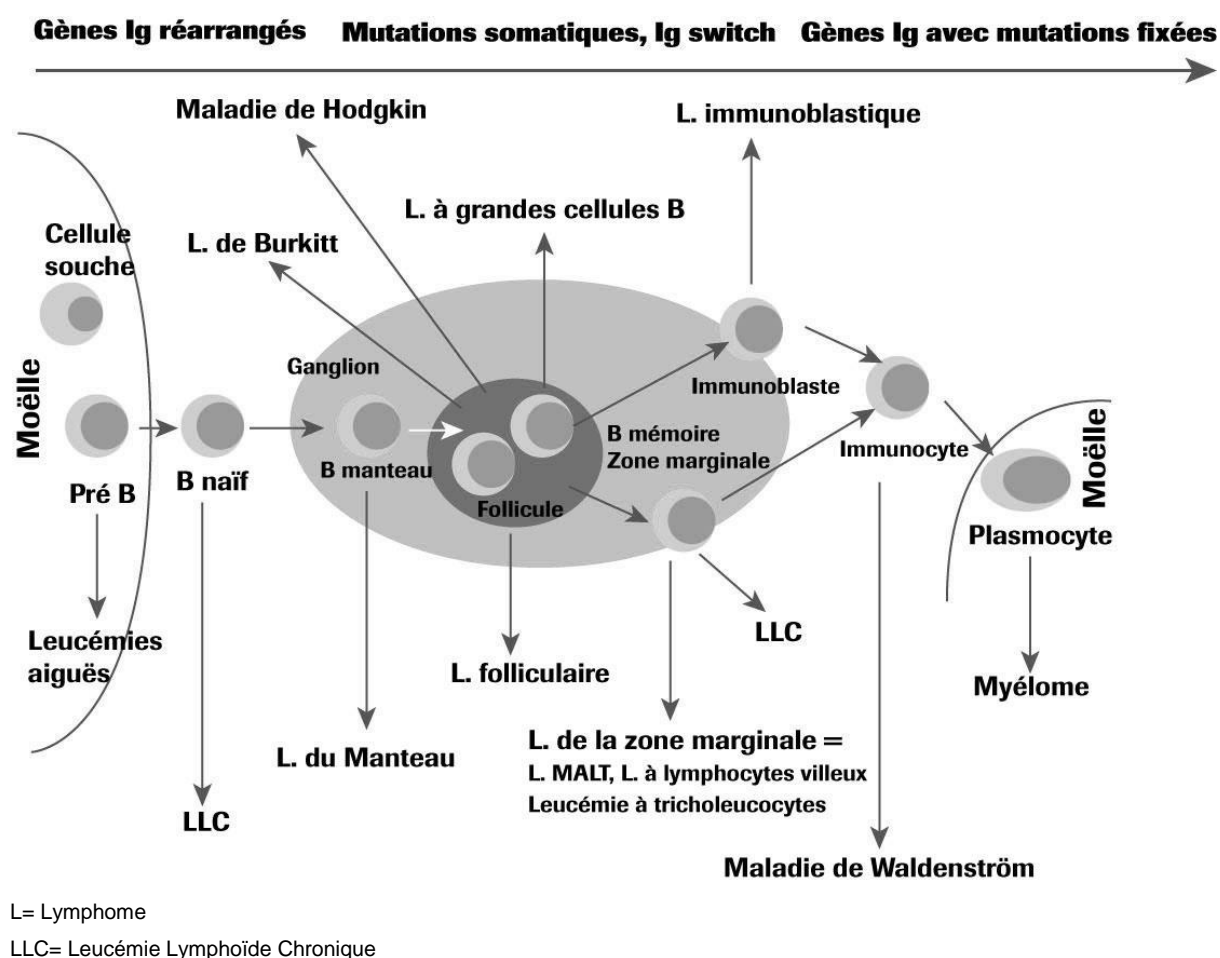


Figure 4 : Ontogénie des lymphocytes et hémopathies malignes lymphoïdes B

source : Garban F., Zelek L., Sotto J.J. Lymphomes malins non hodgkiniens dans «Guide pratique des hémopathies malignes». (MMI Ed. MASSON 2001 : 65-70)

La plupart des SLPC B sont dus à une translocation chromosomique réciproque qui implique un des *loci* des gènes des immunoglobulines et un proto-oncogène. Cette translocation entraîne une dérégulation et une activation constitutive de l'oncogène. Trois points de cassure peuvent être cités dans les gènes des immunoglobulines :

La translocation de type *BCL2-IGH* associée au lymphome folliculaire a un point de cassure qui est adjacent à la région J_H ou à la jonction des régions J_H et D_H de la chaîne lourde. Ces translocations sont dues à des erreurs qui ont lieu au cours de la recombinaison VDJ et donc à un stade précoce du développement du lymphocyte B dans la moelle osseuse.

Dans d'autres cas le point de cassure est retrouvé à l'intérieur ou près de la région V(D)J réarrangée. Ces translocations apparaissent au cours du phénomène d'hypermutation somatique.

Enfin le point de cassure peut se trouver dans la région constante des chaînes lourdes qui ont commutées ce qui indique que ces événements ont lieu au cours du switch de classe. ¹³

2. LES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS CHRONIQUES B (SLPC B) MATURES

Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B matures correspondent à la prolifération maligne d'un clone lymphocytaire B, en général initialement au sein d'un territoire lymphoïde (ganglions, rate, MALT, GALT...) pouvant disséminer secondairement (moelle osseuse, sang...)

Ils représentent un groupe relativement hétérogène d'hémopathies malignes tant par la nature de la cellule maligne et l'origine des différentes entités qui le composent que par les stratégies thérapeutiques spécifiques ou leur pronostic très variable.

La classification OMS décrit un peu plus de quarante entités définies par la combinaison de toutes les informations disponibles incluant les données cliniques, morphologiques, immunophénotypiques et cytogénétiques (Tableau 1).¹⁴

2.1. Epidémiologie

En 2012 le nombre de nouveaux cas de SLPC B matures a été évalué à 20000 en France. Ils représentent l'hémopathie maligne la plus fréquente. Les 3 entités les plus décrites sont le myélome multiple (MM), la LLC et le LBDGC. Ces pathologies sont plus fréquentes chez l'homme que chez la femme avec un sex-ratio (H/F) allant de 1,2 pour le lymphome folliculaire à 4 pour le lymphome du manteau. L'âge médian de découverte s'échelonne de 64 (lymphome folliculaire) à 74 ans (lymphome du manteau) pour l'homme et de 66 (lymphome folliculaire) à 75 ans (MM) pour la femme (Tableau 2).¹⁵

Mature B-cell neoplasms
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
Monoclonal B-cell lymphocytosis*
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
<i>Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>
<i>Hairy cell leukemia-variant</i>
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenström macroglobulinemia
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*
μ heavy-chain disease
γ heavy-chain disease
α heavy-chain disease
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extraosseous plasmacytoma
Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
Nodal marginal zone lymphoma
<i>Pediatric nodal marginal zone lymphoma</i>
Follicular lymphoma
In situ follicular neoplasia*
Duodenal-type follicular lymphoma*
Pediatric-type follicular lymphoma*
<i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement*</i>
Primary cutaneous follicle center lymphoma
Mantle cell lymphoma
In situ mantle cell neoplasia*
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
Germinal center B-cell type*
Activated B-cell type*
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV ⁺ DLBCL, NOS*
<i>EBV⁺ mucocutaneous ulcer*</i>
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK ⁺ large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Primary effusion lymphoma
<i>HHV8⁺ DLBCL, NOS*</i>
Burkitt lymphoma
<i>Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*</i>
High-grade B-cell lymphoma, with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements*
High-grade B-cell lymphoma, NOS*
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma

Provisional entities are listed in italics.
*Changes from the 2008 classification.

Tableau 1 : 2016 WHO classification of mature lymphoid, histiocytic, and dendritic neoplasms

source : Swerdlow et al, "THE UPDATED WHO CLASSIFICATION OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES: The 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid Neoplasms," Blood 127, no. 20 (May 19, 2016): 2375–90.

Hémopathie maligne	Codes morphologiques CIM-O-3	Nombre de cas incidents estimés en France en 2012			Médiane d'âge au diagnostic (années)		Taux d'incidence brut en France en 2012*		Taux d'incidence standardisé en France en 2012**		Sexe-ratio
		Total	H	F	H	F	H	F	H	F	H/F
Lymphome de Hodgkin classique											
Lymphome de Hodgkin classique	96503 à 96553, 96613 à 96673	1 880	1 033	847	42	32	3,3	2,6	3,0	2,7	1,1
Lymphomes non hodgkiniens											
Leucémie lymphoïde chronique / lymphome lymphocytaire	96703, 98233	4 464	2 696	1 768	71	74	8,7	5,4	4,4	2,2	2,0
Lymphome folliculaire	(≥96903 & ≤96983)	2 530	1 303	1 227	64	66	4,2	3,7	2,5	2,1	1,2
Lymphome diffus à grandes cellules B	96783, 96793, 96803, 96843	4 096	2 463	1 633	69	74	8,0	5,0	4,5	2,2	2,0
Lymphome du manteau	96733	659	491	168	74	74	1,6	0,5	0,8	0,2	4,0
Lymphome de la zone marginale	96893, 96993, 97643	1 772	866	906	70	74	2,8	2,8	1,5	1,2	1,3
Myélome multiple & plasmocytome	(≥97313 & ≤97343)	4 888	2 561	2 327	72	75	8,3	7,1	4,2	2,9	1,4
Lymphome lymphoplasmocytaire / macroglobulinémie de Waldenström	97613, 96713	1 247	800	447	73	74	2,6	1,4	1,3	0,6	2,2

* Taux d'incidence brut exprimé pour 100 000 personnes-années.

** Taux d'incidence standardisé sur la population mondiale et exprimé pour 100 000 personnes-années.

H : Homme ; F : Femme.

Tableau 2: Nombre de cas incidents estimés en France en 2012, médiane d'âge, taux d'incidence brut et standardisé monde en 2012, par sexe et par type d'hémopathie maligne

source : <http://www.invs.sante.fr/> Réseau FRANCIM

On distingue les lymphomes de bas grade (ou indolents) des lymphomes de haut grade (ou agressifs). Les lymphomes de bas grade ont une évolution lente et des symptômes modérés au moins au début de la pathologie, ils sont classiquement appelés « à petites cellules ». Les lymphomes de haut grade ont une évolution plus rapide et des symptômes plus bruyants, ils sont classiquement appelés « à grande cellules ». ¹⁶

Parmi les principaux lymphomes on distingue donc :

lymphomes de bas grade	lymphomes de haut grade
LLC	leucémie prolymphocytaire
lymphome folliculaire	LBDGC
lymphome lymphoplasmocytaire	lymphome B à grandes cellules du médiastin
lymphome de la zone marginale splénique	lymphome à grandes cellules intra vasculaire
lymphome du MALT	lymphome de Burkitt
lymphome de la zone marginale ganglionnaire	
lymphome du manteau	

2.2. Facteurs de risque

Les principaux facteurs de risque mis en évidence sont :

- les infections chroniques
 - o virales : notamment VIH, hépatite C, virus Epstein-Barr (EBV) ;
 - o bactériennes : notamment inflammation gastrique chronique due à *Helicobacter pylori* ;
- l'immunodépression chronique (médicaments immunosuppresseurs notamment dans un contexte de greffe d'organe, maladie auto-immune) ;
- l'exposition à des substances particulières (par exemple : dioxine, pesticides agricoles) ;
- les antécédents de chimiothérapie (agents alkylants). ¹⁷

2.3. Clinique

Les SLPC B matures constituent également un groupe très hétérogène au niveau clinique. En raison de la diversité fonctionnelle des cellules lymphoïdes et de leur répartition anatomique ubiquitaire, ces affections peuvent se développer au sein de n'importe quel organe ou tissu de l'organisme. Il n'existe donc pas de présentation clinique spécifique, cependant des circonstances de découverte peuvent être dégagées.

Nous distinguerons les lymphomes indolents des lymphomes agressifs.

Pour les lymphomes indolents l'état général est conservé et on peut observer un syndrome tumoral (adénopathies, splénomégalie, hépatomégalie..) accompagné ou non de complications d'un syndrome hémorragique, anémique ou d'hyperviscosité. Un bilan doit être systématiquement réalisé chez tout patient asymptomatique présentant une hyperlymphocytose, une augmentation de la VS, une ou des cytopénie(s), et un pic ou une hypogammaglobulinémie à l'électrophorèse des protéines.

Pour les lymphomes agressifs l'évolution est subaigüe, les signes cliniques les plus fréquemment retrouvés sont :

- polyadénopathies superficielles, fermes, non douloureuses et non inflammatoires, de taille variable, persistantes pendant plus d'un mois ;
- altération de l'état général avec apparition d'une fièvre, accompagnée de sueurs nocturnes et/ou d'une perte de poids inexpliquée ;
- syndrome compressif lié à la présence d'une masse ganglionnaire profonde ;
- syndrome cave supérieur ;
- dyspnée ;
- dysphonie ;
- dysphagie ;
- douleurs abdominales ;
- syndrome occlusif ;
- compression vasculo-nerveuse ;
- ...

Une biopsie ganglionnaire ou tissulaire doit alors être réalisée. ¹⁸

2.4. Diagnostic

2.4.1. Examen anatomo-pathologique

Avant toute biopsie d'un ganglion persistant, il est nécessaire d'effectuer les examens permettant d'identifier une maladie infectieuse ou systémique causale.

Le diagnostic de lymphome repose sur l'analyse histologique d'une biopsie du site atteint.

La démarche diagnostique du pathologiste repose sur 2 critères morphologiques fondamentaux : l'architecture de la prolifération et les caractères cytologiques des cellules lymphomateuses. Il existe 2 types principaux d'architecture : diffuse ou nodulaire. L'examen morphologique sera complété ensuite par des marquages en immunohistochimie.

2.4.2. Immunophénotypage

L'analyse immunophénotypique peut être réalisée sur une biopsie ganglionnaire, sur moelle osseuse ou sur sang périphérique pour les formes leucémisées. La cytométrie en flux (CMF) joue un rôle diagnostique essentiel dans les différents SLPC B, notamment en cas d'impossibilité de réaliser une biopsie ganglionnaire.

2.4.2.1. Principe de l'immunophénotypage par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer sur une suspension de cellules les caractéristiques individuelles de chaque particule telles que la taille, la forme, la complexité interne et n'importe quel composant ou fonction qui puisse être détecté par un composé fluorescent.

Un cytomètre de flux se compose d'un système fluide pour mettre les cellules en flux laminaire, d'un système optique constitué de lasers, de filtres et de photomultiplicateurs et d'un système informatique pour le traitement des données. Les cellules en suspension passent une à une devant un faisceau laser et des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule tels que :

- la lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules ;
- la lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter – SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules ;
- les signaux de fluorescence :
 - o fluorescence émise par la cellule elle-même (auto fluorescence)
 - o fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome qui se lie spécifiquement à la cellule.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux couplés à des molécules fluorescentes va permettre d'étudier l'expression d'antigènes par les cellules médullaires au cours de leur développement.¹⁹

Les différentes étapes du diagnostic comprennent :

- l'identification des cellules des différentes lignées cellulaires et la détermination de leur degré de maturité ;
- la détection de cellules anormales via l'expression de glycoprotéines ;
- le phénotypage détaillé de la population anormale et la mise en évidence d'une augmentation ou d'une diminution de l'intensité de fluorescence de certains marqueurs par rapport à la population normale ;

- l'établissement du diagnostic si ces informations sont spécifiques d'une pathologie ou d'une liste de pathologies possibles.

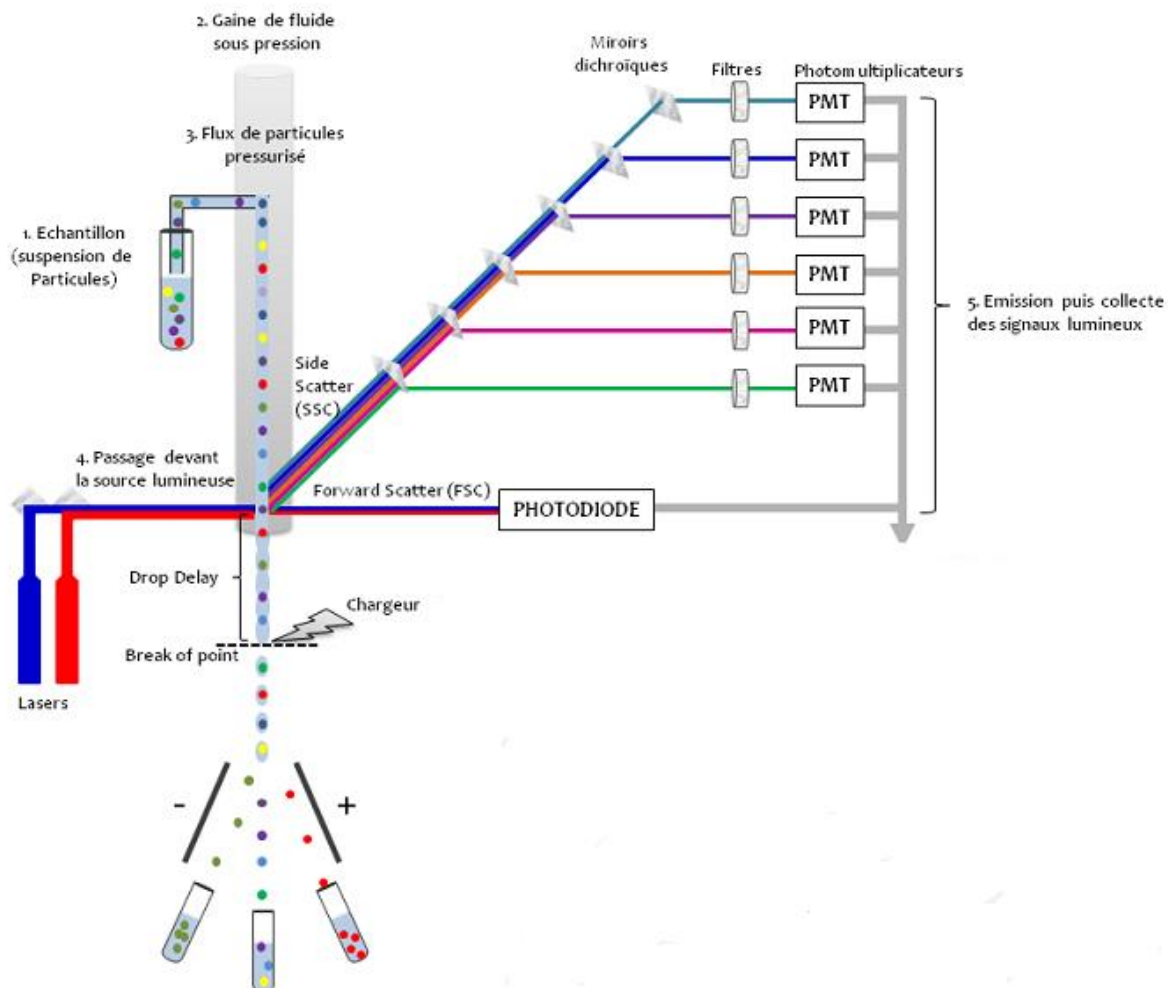


Figure 5 : Principe de fonctionnement de l'analyseur-trieur

source : <http://www.bfa.univ-paris-diderot.fr/> (consulté le 06/06/2016). Cytométrie en flux et Tri cellulaire par Cécile Tourrel-Cuzin - 11 juin 2012

2.4.2.2. Notion de CD

La description d'un grand nombre d'Ag cellulaires a nécessité la création d'un répertoire. Depuis 1982, date du premier *Workshop on human leucocyte differentiation antigens* ayant eu lieu à Paris, les CD ou clusters de différenciation, sont regroupés dans une classification internationale.²⁰ Celle-ci fait régulièrement l'objet de mise à jour dont la dernière a eu lieu en 2014 en Australie. On compte actuellement 371 CD.

Marqueur	Expression normale	SLP-B
CD5	Lymphocytes T et minorité de lymphocytes B	LLC, LCM
CD10	Lymphocytes B et T immatures (centre germinatif), polynucléaires neutrophiles, minorité de lymphocytes B et T matures	LF
CD11c	Quelques lymphocytes B et T	HCL. Parfois faible expression dans LLC, LPL, LZM, SLVL
CD19	Lymphocytes B et plasmocytes	Marqueur de la lignée B
CD20	Lymphocytes B	Marqueur de la lignée B. Faible intensité d'expression dans LLC
Chaînes légères (kappa et lambda) en surface	Lymphocytes B	Indicateur de restriction isotypique
Chaînes légères (kappa et lambda) en intracytoplasmique	Plasmocytes, lymphocytes B	Indicateur de restriction isotypique
CD22	Lymphocytes B	Marqueur de la lignée B. Faible intensité d'expression dans LLC
CD23	Faiblement positif dans les lymphocytes B matures. Expression augmentée lors de l'activation.	Diagnostic différentiel LLC et autre syndrome lymphoprolifératif chronique CD5+
CD24	Expression intermédiaire sur précurseurs B et T.	LZM
CD25	Lymphocytes B et T activés.	HCL, associé à CD103, CD11c et CD123. Rares LPL, LZM, LCM, MW
CD27	Marqueur d'activation des lymphocytes T. Lymphocytes B mémoires.	LLC, SLVL, MZL, LPL-MW
CD38	Cellules centro-folliculaires, cellules T immatures, plasmocytes	Différenciation plasmocytaire Marqueur pronostique dans la LLC
CD43	Lymphocytes T et minorité de lymphocytes B	Expression aberrante dans la LLC Rares LCM et LZM
CD45	Marqueur pan-leucocytaire	Intérêt pour la distinction des hémopathies matures et immatures
CD49d	Lymphocytes B, T, NK, monocytes, plasmocytes	Marqueur pronostique dans la LLC
CD79b	Précurseurs B, plasmocytes. Expression variable sur lymphocytes B	Marqueur de la lignée B. Faible intensité d'expression dans LLC
CD81	Lymphocytes B et T	Intérêt diagnostique dans le MM. MRD LLC
CD103	Minorité de lymphocytes B.	HCL et rares MZL
CD160	Lymphocytes NK et T CD8	HCL (LLC ?)
CD200	Macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, polynucléaires, lymphocytes B, lymphocytes T activés	Diagnostic différentiel LLC/LCM
FMC7	Lymphocytes B matures	Diagnostic différentiel LLC/LCM et autre syndrome lymphoprolifératif CD5+
Bcl-2	Lymphocytes T, minorité de lymphocytes B	FL
ZAP-70	Lymphocytes T, NK, précurseurs B	Marqueur pronostique dans la LLC

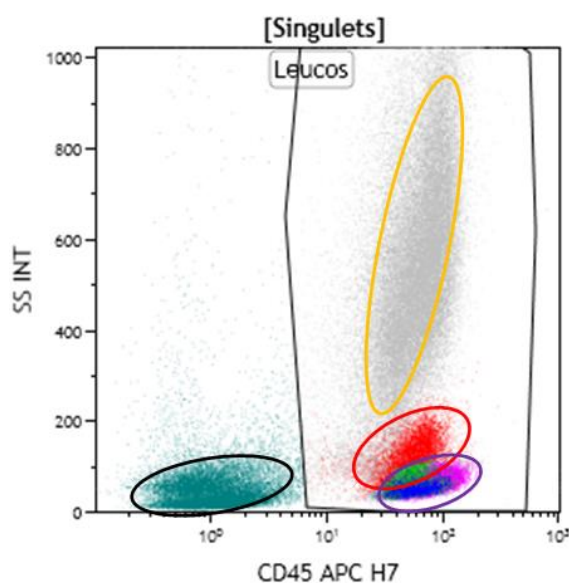
MRD: maladie résiduelle minimale, LLC: leucémie lymphoïde chronique, LF: lymphome folliculaire, LCM: lymphome du manteau, LZM: lymphome de la zone marginale, LPL-B: leucémie à prolymphocytes B, MM: myélome multiple, LPL-MW: lymphome lymphoplasmocytaire/maladie de Waldenström, SLP-B: syndrome lymphoprolifératif chronique B, SLVL: lymphome splénique à lymphocytes villeux, HCL: hairy cell leukemia (leucémie à tricholeucocytes). Adapté d'après Craig et al. (3)

Tableau 3: Antigènes d'intérêt dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B
source : Magali Le Garff-Tavernier, Myrto Costopoulos, and Hélène Merle-Béral, "Place de La Cytométrie En Flux Dans Le Diagnostic et Le Suivi Des Syndromes Lymphoprolifératifs B," *Revue Francophone Des Laboratoires* 2013, no. 452 (2013): 37–48

2.4.2.3. « Gating » ou « fenêtrage » des leucocytes

Toutes les cellules hématopoïétiques expriment le CD45 au cours de leur développement. L'expression du CD45 va persister sur les leucocytes tout au long de leur vie à l'exception des plasmocytes tandis que les érythrocytes et les plaquettes perdent l'expression de ce marqueur au cours de leur différenciation. En regardant le niveau d'expression du CD45 en association avec le SSC, les différentes lignées cellulaires peuvent être identifiées :

- les lymphocytes sont caractérisés par l'intensité la plus forte du CD45 et le signal le plus faible en SSC ;
- la lignée érythrocytaire est caractérisée par la négativité du CD45 et un faible signal en SSC ;
- les monocytes montrent une expression du CD45 un peu plus faible que celle des lymphocytes et des caractéristiques intermédiaires en SSC entre les lymphocytes et les cellules myéloïdes ;
- enfin, les cellules granuleuses sont caractérisées par les signaux les plus intenses en SSC et une expression faible du CD45. ²¹



jaune : cellules granuleuses
rouge : monocytes
violet : lymphocytes
noir : érythrocytes et débris

Figure 6 : Histogramme CD45/SSC

2.4.2.4. Repérage des lymphocytes B matures

Le marqueur CD19 est spécifique des lymphocytes B. Il n'est pas présent sur les lymphocytes T ou NK, ni sur les autres leucocytes.

Les valeurs usuelles des populations lymphocytaires dans le sang périphérique sont :

- 70% de lymphocytes T (CD3+) soit 500 à 2500/ μ l, dont :
 - o 45% de lymphocytes T CD4+ soit 500 à 1200/ μ l ;
 - o 25% de lymphocytes T CD8+ soit 230 à 900/ μ l ;
- 15% de lymphocytes B (CD19+) soit 100 à 600/ μ l ;
- 15% de lymphocytes NK (CD16/56+) soit 140 à 700/ μ l.

En pratique une recherche de clonalité est réalisée lorsque les lymphocytes B sont supérieurs à 500/ μ l.

2.4.2.5. Ratio κ/λ

Physiologiquement deux tiers des lymphocytes B présentent une immunoglobuline de surface composée d'une chaîne légère Kappa et un tiers d'une chaîne légère Lambda. Ce ratio κ/λ est constant et ne varie pas en cas d'hyperlymphocytose réactionnelle.

Contrairement aux populations de lymphocytes B normales ou réactionnelles, les clones de SLPC B matures sont caractérisés par une restriction isotypique (Kappa ou Lambda). Ce phénomène traduit la notion de clonalité et on parle de déséquilibre du ratio κ/λ lorsque celui-ci est supérieur à 3 ou inférieur à 0.3. On peut également observer une absence totale d'expression d'immunoglobuline membranaire.

2.4.2.6. Expression aberrante d'antigènes

Un des types d'expression aberrante d'antigène est la présence d'antigènes non exprimés par les cellules normales. On peut ainsi citer l'expression de CD5 ou de BCL-2. On peut également observer des pertes d'expression de certains antigènes normalement exprimés par les lymphocytes normaux, ou bien l'augmentation ou la diminution d'expression de certains.

Le groupe European Leukemia Net (ELN) a émis des recommandations en 2011, suggérant l'utilisation d'un panel minimal pour l'analyse des SLPC, adaptable au sein de chaque laboratoire.²² Plusieurs groupes nationaux et internationaux travaillent actuellement sur l'élaboration de recommandations françaises et européennes, concernant aussi bien le choix des antigènes à rechercher que les méthodes de standardisation inter-laboratoires (Groupe

d'étude immunologique des leucémies ou GEIL, ELN, Euroflow, etc.) de nombreux marqueurs pouvant être utilisés pour le diagnostic des SLPC-B. ²³

Aucun profil n'est spécifique d'un lymphome en particulier cependant la combinaison de plusieurs antigènes peut permettre d'orienter le diagnostic, Craig et al., ont ainsi classé les SLPC B matures en quatre catégories selon l'expression de CD5 et CD10 (Tableau 4). ²⁴

Disease entities to consider	Distinguishing phenotypic features	Additional diagnostic information
CD5⁺ CD10⁻		
Chronic lymphocytic leukemia	Typical phenotype: CD20 (d), CD22 (d), slg (d), CD23 ⁺ , FMC-7 ⁻	Characteristic morphology
Mantle cell lymphoma	Variable phenotype not typical for CLL; often CD20 (i), slg (i), CD23 ^{+/+} , FMC-7 ^{+/+}	Cyclin-D1 IHC, t(11;14)/CCND rearrangement
Polymphocytic leukemia	Variable phenotype, may overlap with CLL and MCL CD20 (+i), slg (+i), FMC-7 ^{+/+} , CD5 ^{+/+}	Large cells prominent nucleoli; exclude blastic MCL
Marginal zone B-cell lymphoma	Variable phenotype, not typical for CLL: CD23 ⁻ ; often CD11c ^{+/+} , CD103 ^{+/+} but not typical for HCL, sometimes clg only	Growth around and into follicles, may demonstrate plasmacytic differentiation, t(11;18), t(1;14), t(14;18)/MALT-1 rearrangement
Diffuse large B-cell lymphoma	Variable phenotype	Large cells, diffuse growth pattern; consider Richter transformation CLL and MCL
Lymphoplasmacytic lymphoma	Phenotype not typical for CLL, often CD23(-/d), sometimes slg ⁻ but clg ⁺	Small cells, subset with plasmacytic differentiation Primarily PB and BM
CD5⁻ CD10⁺		
Follicular lymphoma	Usually bcl-2 ⁺ , CD43 ⁻	Some follicular growth, t(14;18)/BCL-2 rearrangement
Diffuse large B-cell lymphoma	Variable phenotype, bcl-2 ^{+/+} , CD43 ^{+/+}	Large cells somewhat pleomorphic, diffuse growth
Burkitt lymphoma	Usually bcl-2 ⁻ , CD10 (+b), CD43 ⁺	Uniform intermediate size cells; MYC rearrangement, Ki-67 approximately 100%
Hairy cell leukemia	Typical phenotype: CD20 (b), CD22 (b), CD11c (b), CD25 ⁺ , CD103 ⁺ , slg (i), CD123 ⁺	Characteristic morphology; Annexin-A1 ⁺
CD5⁺ CD10⁺		
Follicular lymphoma	Usually bcl-2 ⁺ , CD43 ⁻	Some follicular growth, t(14;18)/BCL-2 rearrangement
Diffuse large B-cell lymphoma	Variable phenotype, bcl-2 ^{+/+} , CD43 ^{+/+}	Large cells, diffuse growth pattern
Mantle cell lymphoma	Variable phenotype not typical for CLL; often CD20 (i), slg (i), CD23 ^{+/+} , FMC-7 ^{+/+}	Cyclin-D1 IHC, t(11;14)/CCND rearrangement
Burkitt lymphoma	Usually bcl-2 ⁻ , CD10 (b), CD43 ⁺	Uniform intermediate size cells; MYC rearrangement, Ki-67 approximately 100%
CD5⁻ CD10⁻		
Hairy cell leukemia	Typical phenotype: CD20 (b), CD22 (b), CD11c (b), CD25 ⁺ , CD103 ⁺ , slg (i)	Confirm characteristic morphology
Marginal zone B-cell lymphoma	Often CD11c ^{+/+} , CD103 ^{+/+} but not typical for HCL, sometimes slg ⁻ but clg ⁺	Growth around and into follicles, maybe plasmacytic t(11;18), t(1;14), t(14;18)/MALT-1 rearrangement
Diffuse large B-cell lymphoma	Variable phenotype	Large cells, diffuse growth pattern
Follicular lymphoma CD10 ⁻	Variable phenotype	Some follicular growth, t(14;18)/BCL-2 rearrangement
Mantle cell lymphoma CD5 ⁻	Variable phenotype	Cyclin-D1 IHC, t(11;14)/CCND rearrangement

+ indicates usually positive; -, usually negative; +/-, may be positive or negative; d, dim or weak intensity; i, intermediate intensity; b, bright or strong intensity; slg, surface immunoglobulin; and clg, cytoplasmic immunoglobulin.

Tableau 4 : Approche par cytométrie en flux pour le diagnostic et la classification des SLPC B matures
source : F. E. Craig and K. A. Foon, "Flow Cytometric Immunophenotyping for Hematologic Neoplasms," *Blood* 111, no. 8 (January 11, 2008): 3941–67

2.4.2.7. Caractéristique phénotypiques de certains SLPC-B

2.4.2.7.1. La leucémie lymphoïde chronique B

La LLC fait partie des SLPC B les mieux définis phénotypiquement et dont les cellules sont facilement accessibles dans le sang périphérique. Suspecté sur l'hémogramme, le diagnostic de LLC est confirmé par l'étude des marqueurs de membrane par CMF dans le sang. La détection d'une chaîne légère Kappa ou Lambda permet d'affirmer la monotypie et la diminution de son expression reflète la diminution de la densité antigénique du récepteur B à l'antigène (BCR) par rapport aux cellules B normales, qui est une caractéristique de cette maladie. La molécule CD5, habituellement observée à la surface des lymphocytes T et sur une minorité de lymphocytes B à l'état normal, et le CD23, marqueur d'activation des cellules B, sont retrouvés de façon quasi constante à la surface des lymphocytes pathologiques. Ces caractéristiques immunophénotypiques de la LLC ont permis à l'équipe de Matutes et al., de définir en 1994 le système de score du Royal Marsden Hospital (appelé couramment score de Matutes).²⁵ Ce score a été ensuite réévalué par Moreau en 1997.²⁶ Il attribue un score à 5 marqueurs :

Cotation	1	0
CD5	+	-
CD23	+	-
Expression Ig de surface	faible	forte
FMC7	-	+
Expression CD79b	faible	forte

Une LLC a un score total de 5 ou 4. Seulement 5 % des LLC ont un score de 3. Un score inférieur à 3 exclut une LLC et correspond à un LNH B. (Figure 7)

Score	Number of Cases (%)		
	CLL	Other B-Cell Leukemias ^a	B-NHL ^b
5	209 (52)	0 (0)	0 (0)
4	139 (35)	0 (0)	1 (0.5)
3	39 (10)	1 (1)	7 (4)
2	11 (3)	8 (10)	43 (23)
1	1 (0.2)	25 (33)	75 (39)
0	1 (0.2)	43 (56)	63 (33)
Total	400	77	189

^aB-PLL, HCL, and HCL-V (details in Table 5).

^bSLVL, follicular, lymphoplasmacytic, mantle-cell, and large-cell NHL in leukemic phase (details in Table 6).

Comparison between CLL and other B-cell leukemias: scores 0, 1, 2 vs. 3, 4, 5 ($p < 0.0001$). Comparison between CLL and B-NHL: scores 0, 1, 2 vs. 3, 4, 5 ($p < 0.0001$).

Figure 7 : Application du score aux SLPC B matures

source : Matutes et al., "The Immunological Profile of B-cell Disorders and Proposal of a Scoring System for the Diagnosis of CLL," *Leukemia* 8, no. 10 (October 1994): 1640–45

2.4.2.7.2. La leucémie polymphocytaire B

Le phénotype des polymphocytes est celui d'une cellule B mature, CD22/CD79b+, CD23/CD10- et exprimant fortement les chaînes légères des immunoglobulines. Le CD5 est retrouvé dans environ 1 cas sur 2, le CD11c et le CD25 plus rarement.²⁷

2.4.2.7.3. Le lymphome du manteau (LM)

Les cellules du LM expriment les marqueurs pan-B, CD19 et CD20. Le LM est caractérisé, comme la LLC, par l'expression quasi constante du CD5 mais s'en différencie par la négativité du CD23 et un score de Matutes inférieur à 3 avec une expression forte du CD20 et du CD79b.²⁸ Le CD200 prend une place de plus en plus prépondérante dans le diagnostic différentiel entre le LM (CD200-) et la LLC de phénotype atypique (CD200+, score de Matutes à 3).²⁹

2.4.2.7.4. Le lymphome folliculaire (LF)

L'immunophénotype se caractérise par la présence du CD10, physiologiquement exprimé sur les cellules du centre germinatif et dans la majorité des cas par l'absence de CD5 et de CD23, qui permettent le diagnostic différentiel avec la LLC.³⁰

2.4.2.7.5. La leucémie à tricholeucocytes

Les tricholeucocytes ont un profil phénotypique spécifique qui permet une caractérisation aisée par CMF. Classiquement, ce sont des cellules B matures identifiables grâce à l'expression simultanée et quasi constante de 3 marqueurs : le CD103, une intégrine presque spécifique de ce type de lymphome ; le CD11c autre intégrine retrouvée sur des sous-populations de lymphocytes B et T et le CD25 qui correspond à la chaîne α du récepteur à l'IL-2. Plus récemment ont été décrites à la surface des tricholeucocytes d'une forte expression du CD305 (LAIR-1) et du CD123 qui correspond à la chaîne α du récepteur à l'IL-3. Le score de Matutes est presque toujours inférieur 2. ³¹

2.4.2.7.6. Le lymphome de la zone marginale

Les différentes entités regroupées sous le terme de lymphome de la zone marginale (LZM) ont des caractéristiques phénotypiques communes mais n'ont pas de marqueur spécifique et correspondent, du point de vue de l'immunomarquage, à un diagnostic d'élimination. Les cellules lymphomateuses sont généralement fortement positives pour les marqueurs pan-B et peuvent exprimer le CD11c et le CD103. Elles sont le plus souvent CD5/CD23-. Cependant, il existe des formes CD5+ ce qui peut rendre le diagnostic particulièrement difficile. La présence de cellules avec co-expression du CD38 et de CD138 traduisant une différenciation plasmocytaire est observée dans une proportion significative de LZM. Le CD27 et le CD24 peuvent être d'une aide précieuse pour distinguer les LZM (généralement positifs) et les lymphomes spléniques diffus de la pulpe rouge de la rate (généralement négatifs). ³² La sous-classe des SLVL diffère des LZM non villeux par l'expression fréquente du CD103 et du CD11c mais d'intensité plus faible que les tricholeucocytes. ³³

2.4.2.7.7. Le lymphome lymphoplasmocytaire et la maladie de Waldenström (MW)

Dans les cas de MW avec un clone B circulant, le phénotypage met en évidence une expression modérée des Ig de surface ainsi que des marqueurs pan-B. Le score de Matutes est, dans la majorité des cas, inférieur à 3. Le CD5 est d'expression variable, le CD23 et le CD10 sont rarement exprimés, contrairement aux CD25, CD22 et CD38. Ce dernier est faiblement exprimé dans un à deux tiers des cas reflétant probablement la nature lymphoplasmocytaire du clone. Cependant, aucun marquage spécifique n'a été formellement identifié. Une hétérogénéité intraclonale immunophénotypique a été rapportée. ³⁴

	LLC	LPL-B	LCM	LF	LZM	HCL	SLVL	LPL-MW
CD19	+	+	+	+	+	+	+	+
CD5	+	+/-	+	-	-/+	-	-/+	-
CD23	+	-	-	-/+	-	-	-/+	-
sIg	Faible ou -	++	++	++	++	+++	+++	Faible à moyenne
FMC7	Faible ou -	+	+	+	++	++	+++	+/-
CD22	Faible ou -	+	+	+	+	++	++	+
CD79b	Faible ou -	+	+	+	+	+	++	+
CD10	-	-/+	-	+/-	-	-/+	-	-
CD103	-	-	-	-	-/+	+	-	-
CD11c	-/+	-	-	-	+/-	+	+	-
CD25	-/+	-	-	-	+/-	+	-	+
CD43	++	-	-/+	-	-	-/+	-	-
CD20	Faiblement +	+	+	+	+	++	++	+

+ : généralement positif; - : généralement négatif; +/- : habituellement positif mais peut être négatif; -/+ : habituellement négatif mais peut être positif.
sIg: immunoglobulines de surface (évaluées par l'expression des chaînes légères kappa ou lambda), LLC: leucémie lymphoïde chronique,
LPL-B: leucémie à prolymphocytes B, LCM: lymphome du manteau, LF: lymphome folliculaire, LZM: lymphome de la zone marginale,
HCL: hairy cell leukemia (leucémie à tricholeucocytes), LPL-MW: lymphome lymphoplasmocytaire/maladie de Waldenström

Tableau 5 : Caractéristiques phénotypiques des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B

source : Virginie Eclachea and Fanny Baran-Marszaka, "Intérêt de La Cytogénétique et de La Biologie Moléculaire Pour Le Diagnostic Des SLP B Eclache.pdf," *Revue Francophone Des Laboratoires* 452 (05/20103): 49–59

2.4.3. Biologie moléculaire et cytogénétique

2.4.3.1. Identification d'une prolifération B clonale par PCR

Les modifications cytogénétiques impliquent presque toujours un gène des immunoglobulines dans les lymphomes B.

Chaque lymphocyte B possède une séquence ADN $V_H-D_H-J_H$ propre dont les régions FR (Framework) conservées peuvent être reconnues par des amorces consensus permettant l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de cette région. Cette approche permet de mettre en évidence la présence d'un clone de lymphocytes B identiques possédant le même réarrangement VDJ et d'affirmer qu'une prolifération lymphocytaire B est clonale ou réactionnelle (polyclonale).

Les différents tests disponibles permettent d'amplifier l'ADN ou l'ADNc compris entre les régions FR1, FR2 ou FR3 et JH pour les réarrangements des chaînes lourdes ; entre les régions V_λ ou V_κ et J pour les réarrangements des chaînes légères.

Chaque cellule B a un réarrangement VDJ unique en longueur et en séquence. Lorsque l'ADN normal ou polyclonal est amplifié, un aspect gaussien des amplicons est obtenu. Si l'échantillon contient une population clonale, un ou deux amplicons sont majoritaires sous forme de pic ou de bande (en gel) dans un environnement polyclonal diminué.³⁵

A ces techniques peuvent également se rajouter un séquençage d'une partie des gènes des immunoglobulines.

2.4.3.2. Anomalies cytogénétiques diagnostiques

La cytogénétique conventionnelle, méthode de référence pour la mise en évidence des translocations, peut-être complétée par des techniques de FISH (hybridation in situ en fluorescence).

Les résultats de cette analyse permettent de distinguer des anomalies primaires fréquemment associées à un type de lymphome particulier. On peut ainsi citer la translocation t(8;14)(q24 ;q32) entraînant un remaniement de *MYC* retrouvée dans 75 % des cas de lymphomes de Burkitt ; la translocation t(14;18)(q32;q21) entraînant un remaniement de *BCL2* retrouvée dans 80% des lymphomes folliculaires et 20% des LBDGC ou encore la translocation t(11;14) pour le lymphome du manteau.

2.4.3.3. Facteurs pronostiques de la LLC

Ces dernières années, de nouveaux marqueurs pronostiques permettent de mieux prédire l'évolution de la maladie afin de traiter les patients en fonction de leur risque d'évolution.

Parmi les anomalies cytogénétiques, la plus fréquente est la délétion 13q14, retrouvée chez 55 % des patients, elle serait plutôt de bon pronostic. A l'inverse les délétions 17p13 et 11q22-23 sont associées à un mauvais pronostic.

Ces deux dernières délétions ont pour conséquence la perte des gènes *TP53* et *ATM* respectivement. Des anomalies des gènes *TP53* ou *ATM* sont ainsi associées à un mauvais pronostic.

Le statut mutationnel *IGVH* est considéré comme le plus important facteur pronostique dans la LLC et permet de classer les patients en fonction de leur risque de progression. Les gènes non mutés et proches de la structure germinale sont de mauvais pronostic.³⁶

2.5. Bilan d'extension des LNH

Le bilan d'extension de la maladie est nécessaire pour décider du traitement et permet également de déterminer le pronostic de la maladie

- Biologie :
 - o biopsie ostéomédullaire, généralement complétée par un myélogramme (recherche d'une atteinte médullaire) ;
 - o ponction lombaire éventuelle avec analyse cytologique et biochimique du LCR (recherche d'une atteinte méningée pour certains lymphomes agressifs).
- Imagerie :
 - o Tomodensitométrie (TDM) abdominale et pelvienne ;
 - o TEP-scanner au FDG pour les LBDGC ;
 - o selon les cas : radiographie thoracique et échographie abdominale et pelvienne, TEP-scanner au FDG, IRM.

2.6. Classifications des LNH

2.6.1. Classification d'Ann Arbor

L'étendue de la maladie est appréciée selon la classification d'Ann Arbor (excepté pour les lymphomes cutanés):

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

Le stade est complété de :

- la lettre A : en l'absence de signes généraux d'évolutivité (fièvre >38° durant au moins une semaine, hypersudation nocturne abondante, amaigrissement de plus de 10% en six mois) ;
- la lettre B : si présence d'au moins un signe général ;
- la lettre E : si atteinte extra-ganglionnaire contiguë à une atteinte ganglionnaire.

2.6.2. Classification de Binet

Pour la LLC, une première classification avait été établie en 1975 par Rai.³⁷ A l'heure actuelle en France la classification la plus utilisée est celle de Binet pour apprécier le pronostic et participer aux indications thérapeutiques.³⁸

Celle-ci distingue trois stades :

- stade A : moins de trois aires lymphoïdes superficielles atteintes ;
- stade B : au moins trois aires lymphoïdes superficielles atteintes ;
- stade C : anémie (avec hémoglobine < 10g/l) et/ou thrombopénie (avec plaquettes < 100 G/l) quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes superficielles atteintes.

2.6.3. Index pronostiques

Le bilan d'extension et la classification d'Ann Arbor permettent le calcul d'index pronostiques :

- LNH agressifs : le pronostic d'un LNH diffus à grandes cellules B est apprécié selon le score IPI (Index Pronostic international), défini selon le stade d'Ann Arbor, l'âge et l'état général du patient, le taux sérique de LDH et le nombre d'atteintes extra ganglionnaires ;
- LNH indolents : le score FLIPI (Index Pronostique International des Lymphomes Folliculaires) peut être utilisé comme index pronostique des lymphomes folliculaires. Il tient compte de l'âge du patient, du taux sérique de LDH, de l'hémoglobinémie, du stade d'Ann Arbor et du nombre d'aires ganglionnaires atteintes.
D'autres classifications pronostiques peuvent être utilisées : FLIPI 2, critères du GELF. Il existe également un score MIPI pour le lymphome du manteau qui prend en compte le marqueur Ki67.

2.7. Bilan pré thérapeutique des LNH

- Biologie :
 - o ionogramme sanguin, uricémie, calcémie, phosphorémie (notamment à la recherche d'un syndrome de lyse) ;
 - o CRP ;
 - o électrophorèse des protéines, suivie, en cas d'anomalie, d'une immunofixation ;
 - o créatininémie et estimation du débit de filtration glomérulaire (DFG) ;
 - o taux sérique de LDH ;
 - o évaluation de la fonction hépatique (transaminases, PAL, bilirubine directe et indirecte, gamma GT) ;
 - o sérologies hépatites B et C, VIH ;
 - o test de grossesse chez une femme en âge de procréer ;

- selon les cas : dosage de la bêta-2-microglobuline (lymphome folliculaire), sérologie *Helicobacter pylori* (lymphomes gastriques), dosage des immunoglobulines, pour les patients ayant une cicatrice sérologique d'hépatite B non vaccinale ou un portage B, évaluation de la charge virale.
- Préservation de la fertilité
- Autres examens :
 - endoscopie en présence de point d'appel ORL, bronchique, digestif ou urologique
 - biopsie cutanée en présence de point d'appel dermatologique ;
 - évaluation de la fonction cardiaque (ECG, exploration de la fonction ventriculaire gauche par échographie ou scintigraphie) selon les traitements systémiques envisagés (anthracyclines) ;
 - évaluation de la fonction respiratoire (EFR incluant gaz du sang) en cas d'antécédents respiratoires ;
 - évaluation gériatrique (test neuropsychologique, bilan nutritionnel, évaluation sociale) ;
 - examen et soins dentaires avant traitement.

2.8. Stratégies thérapeutiques des LNH

2.8.1. Lymphomes non hodgkiniens agressifs

La prise en charge du LBDGC peut être considérée comme représentative de celle d'une majorité des formes de LNH agressifs.

Les LNH agressifs nécessitent l'introduction d'un traitement quel que soit leur stade au moment du diagnostic. Les options thérapeutiques comprennent :

- la chimiothérapie ;
- l'immunothérapie ;
- la radiothérapie ;
- la greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Le traitement de référence repose sur une immunochemiothérapie de première intention. Elle associe 6 à 8 cycles d'une polychimiothérapie (habituellement de type CHOP) à un anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab), chaque cycle est séparé de 2 à 4 semaines. Le schéma d'administration peut être adapté selon le score IPI du patient et l'état général de celui-ci.

Une radiothérapie peut être proposée dans certains cas discutés en RCP.

L'évaluation de la réponse au traitement est réalisée dès les premiers cycles. Elle est comparative avec les examens du bilan initial.

La prophylaxie des rechutes neuroméningées doit être discutée en RCP chez les patients présentant des localisations spécifiques à haut risque (sinus, palais, masses paravertébrales, moelle osseuse, testis, sein et ovaire) mais également chez les patients ayant un score IPI élevé, et repose habituellement sur une injection intrathécale de méthotrexate lors des 4 premiers cycles de chimiothérapie.

Une intensification de traitement par une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques est indiquée chez les patients de mauvais pronostic (en fonction de l'âge).

2.8.2. Lymphomes non hodgkiniens indolents

La prise en charge du lymphome folliculaire (80 % des formes indolentes) peut être considérée comme représentative de celle d'une majorité des formes de LNH indolents. Les lymphomes indolents évoluent le plus souvent sur plusieurs années mais sont difficilement curables. Ils peuvent se transformer en lymphomes agressifs de type variable. Les options thérapeutiques sont décidées en fonction de la masse tumorale (faible ou forte), du retentissement clinique et biologique du lymphome ainsi que de l'état général du patient. Elles comprennent :

- l'abstention thérapeutique ;
- la chimiothérapie ;
- l'immunothérapie ;
- la radiothérapie.

En dehors de protocoles de recherche, les patients asymptomatiques et avec une faible masse tumorale (20 à 30 % des patients) relèvent habituellement d'une abstention thérapeutique avec surveillance régulière de l'évolution de la maladie et de la masse tumorale.

Lorsqu'un traitement s'avère nécessaire, le traitement de référence repose sur une immunochemiothérapie. Elle associe une polychimiothérapie (habituellement de type CHOP ou CVP) à un anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab), administrés sur 6 à 8 cycles de 3 semaines. Si ce traitement est impossible (contre-indication à une immunothérapie par anticorps monoclonal anti-CD20 par exemple), une association de polychimiothérapie (CHOP) et d'interféron alpha peut être proposée. L'évaluation de la réponse au traitement est réalisée dès les premiers cycles et en fin de traitement.

En cas de rechute, un traitement de consolidation par une greffe de cellules souches hématopoïétiques doit être discuté par l'équipe spécialisée. Une radio-immunothérapie par ibritumomab est indiquée pour les lymphomes folliculaires en traitement des rechutes après traitement par le rituximab. Pour les formes localisées, un traitement local par irradiation doit être discuté en RCP.³⁹

2.9. Les lymphomes composites

Les syndromes lymphoprolifératifs B correspondent à une prolifération et à une accumulation de lymphocytes B malins à un stade donné de différenciation. L'hypothèse physiopathologique retenue est qu'ils résultent de l'expansion monoclonale d'un seul lymphocyte B transformé. Ainsi toutes les cellules tumorales possèdent la même mutation, le même réarrangement VDJ de la chaîne lourde des immunoglobulines et la même restriction d'expression de la chaîne légère. Au cours de l'évolution de la maladie, diverses modifications génétiques ou phénotypiques peuvent s'ajouter. Ainsi la présence de deux populations tumorales morphologiquement différentes chez le même patient, observées simultanément ou à 2 moments différents, est généralement interprétée comme deux étapes différentes de maturation au sein de la même lignée tumorale.

La transformation d'un lymphome de bas grade en lymphome de haut grade est fréquente. L'apparition de lymphome diffus à grandes cellules chez des patients souffrant de lymphome de bas grade est associée à une aggravation des symptômes et à une diminution de la survie. La transformation histologique a été décrite pour les LLC, les lymphomes lymphocytiques, les lymphomes folliculaires, les lymphomes du manteau et les lymphomes du MALT.⁴⁰ Cela peut alors se traduire par l'apparition d'anomalies cytogénétiques surajoutées visibles au caryotype. Le risque de transformation est identique chez les patients non traités et chez les patients ayant déjà bénéficié d'un traitement.⁴¹

Cependant, il existe des cas de biclonalité qui ont été rapportés.^{42 43 44 45 46 47 48 49 50 51}

Dans environ 4 à 5% des cas, on peut retrouver lors d'un immunophénotypage deux ou trois populations B clonales.⁵² Ces cas sont appelés lymphomes ou LLC biclonaux, ils font partie d'un groupe plus large d'hémopathies appelées lymphomes composites.

La notion de lymphome composite a été introduite pour la première fois en 1954 par l'équipe de Custer et al., et définie comme la coexistence de plus d'un type de lymphome chez le même patient.⁵³ Rapaport et al., a modifié la définition pour inclure deux types ou plus de lymphomes bien démarqués dans le même site anatomique ou la même masse.⁵⁴ Kim et al.,

a ensuite étendu la définition à la combinaison d'un lymphome Hodgkinien et d'un lymphome non Hodgkinien.⁵⁵

Le terme de lymphome composite est aujourd'hui restreint à la rare coexistence de deux clones lymphomateux dans un même site anatomique.⁵⁶ Quand deux types de lymphomes sont diagnostiqués dans des sites différents, on utilise les termes simultanés ou séquentiels selon qu'ils sont observés au même moment ou à deux moments différents respectivement.

⁵⁷

La question d'une origine commune ou non des clones se pose et n'est toujours pas clairement élucidée. Pour tenter de répondre à cette question de nombreuses techniques ont été utilisées : caryotype, séquençage du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines...

En effet la différenciation entre la présence d'un lymphome biclonal et la transformation d'un lymphome de bas grade est difficile aussi bien du point de vue de la morphologie en cytologie, du phénotype en CMF que de l'étude cytogénétique ou de biologie moléculaire. Bien que la transformation de lymphomes de bas grade en lymphomes de haut grade soit fréquente, la relation clonale entre les deux lymphomes et le mécanisme pathogénétique à l'origine de l'évolution de la pathologie sont largement débattus. La transformation peut impliquer différentes voies, variant selon la nature et l'origine de la cellule B progénitrice.⁵⁸

3. ETUDE

3.1. Patients et prélèvements

Nous avons réalisé une étude rétrospective sur les patients pour lesquels un immunophénotypage effectué entre janvier 2013 et fin août 2016 a mis en évidence un nombre de populations clonales supérieur ou égal à deux.

Les données immunophénotypiques issues de l'acquisition sur le cytomètre ont été réanalysées, et lorsque celle-ci avait été réalisée, les résultats de l'analyse cytogénétique ont été récoltés.

Pour certains patients un séquençage nouvelle génération (NGS) de la partie variable du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines a été réalisé.

Enfin, lorsqu'elles étaient disponibles, un certain nombre de données biologiques et cliniques ont été récoltées.

3.2. Analyse par cytométrie en flux

La préparation des prélèvements a été réalisée selon le protocole décrit en Annexe 1.

Les événements cellulaires ont été acquis sur un cytomètre Navios (Beckman-Coulter) et l'analyse des fichiers de données a été faite sur les logiciels Navios Software ou Kaluza.

3.2.1. Marquage des sous populations lymphocytaires

Le marquage des sous populations lymphocytaires a été réalisé avec le panel d'anticorps monoclonaux suivant :

- marqueur pan-leucocytaire : CD45 ;
- marqueurs des lymphocytes T : CD3, CD4 et CD8 ;
- marqueurs des lymphocytes NK : CD16 et CD56 ;
- marqueur des lymphocytes B : CD19.

La population lymphocytaire a été ciblée sur l'histogramme CD45/SSC et parmi celle-ci la population de lymphocytes B sur l'histogramme CD19/SSC.

3.2.2. Marquage des lymphocytes B

Le marquage des lymphocytes B a été réalisé avec le panel d'anticorps monoclonaux suivant :

- en systématique : CD5, CD19, CD23, CD45, CD79b, FMC7, KAPPA et LAMBDA ;
- en cas de score de Matutes ≤ 3 : CD10, CD19, CD20, CD22, CD43, CD45 et CD25 jusqu'en décembre 2015 ou CD180, CD200 et ROR après Décembre 2015;
- en cas de suspicion d'une leucémie à tricholeucocytes : CD11c, CD19, CD25, CD45, CD103 et CD123.

Les résultats pour chaque antigène sont exprimés en pourcentage de cellules positives à l'intérieur de la population cible. Un marqueur membranaire est considéré positif s'il est exprimé par 30% ou plus des cellules analysées. Pour les marqueurs CD79b, KAPPA et LAMBDA l'intensité du marquage est définie par rapport à la population négative pour ce marqueur : l'intensité sera considérée comme faible si le rapport de la médiane de la population étudiée sur la médiane de la population négative pour ce marqueur est inférieur à 10, et modérée/forte si le rapport est supérieur à 10.

3.3. Analyse du caryotype et analyse par FISH

La préparation de l'analyse cytogénétique a été réalisée selon le protocole décrit en Annexe 2.

3.3.1. Réalisation du caryotype

Après préparation d'un buffy coat les cellules ont été mises en culture pendant 24h. Après arrêt de la culture, un choc hypotonique et la fixation de la suspension cellulaire ont été réalisés sur l'automate Excilone. Les suspensions cellulaires obtenues ont ensuite été étalées sur des lames puis dénaturées et colorées afin d'obtenir des bandes RHG permettant l'identification des chromosomes.

La recherche de mitoses a été faite sur un microscope automatique (Metafer) et le caryotype a été réalisé informatiquement à l'aide du logiciel Ikaros sur une vingtaine d'entre elles.

3.3.2. Réalisation de l'analyse par FISH

Le protocole utilisé pour l'analyse par hybridation in situ en fluorescence (FISH) est décrit dans l'Annexe 3.

L'hybridation in situ en fluorescence met en jeu deux protagonistes : l'ADN chromosomique présent dans les métaphases et les cellules interphasiques, et la sonde marquée directement ou indirectement par des fluorochromes.

La préparation des lames pour la recherche de délétion des gènes *TP53* et *ATM* est identique à l'analyse caryotypique. Après étalement des suspensions cellulaires, les lames ont été dénaturées. Et après dénaturation des sondes dans un thermocycleur « Crocodile III », celles-ci ont été hybridées sur les lames. L'interprétation des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel Isis.

3.4. Séquençage nouvelle génération (NGS) du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines

La détection des réarrangements clonaux du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines a été réalisée à l'aide du séquenceur MiSeq Illumina.

Il s'agit d'un séquençage « by synthesis » de 300 cycles avec lecture en « paired end » (2 x 150 paires de bases).

3.4.1. Préparation de la librairie de séquençage

Une librairie de séquençage a préalablement été créée. Celle-ci contenait pour chaque patient :

- le segment d'intérêt avec les amorces spécifiques des segments VH (FR2) et JH de PCR ayant servi à l'amplifier (Annexe 9) ;
- deux index spécifiques de chaque échantillon ;
- deux adaptateurs permettant la fixation de la librairie sur la flow cell de séquençage.

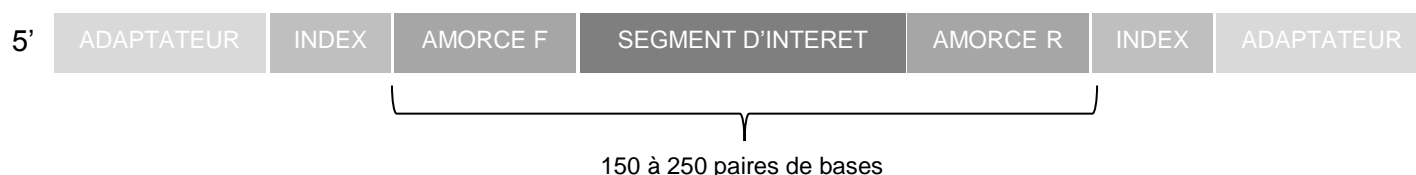


Figure 8 : Préparation d'un segment d'intérêt pour la librairie de séquençage

Une première PCR a permis d'obtenir les séquences d'intérêt. Les index (kit d'index Illumina Nextera XT) et les adaptateurs ont été rajoutés au cours d'une deuxième PCR grâce à des queues flottantes (Illumina qi) présentes sur les amorces.

Après extraction d'ADN à partir des cellules mononuclées isolées par gradient de densité et conservées en culot sec congelé (kit Wizard genomic DNA purification, Annexe 5) la première PCR a été réalisée selon le protocole décrit en Annexe 6 sur thermocycleur VERITI.

La suite du protocole est décrite en Annexe 7. Après purification des produits de PCR1 sur robot Hamilton, la deuxième PCR a été réalisée avec le kit Phusion DNA Polymerase (Life technologies) sur thermocycleur VERITI avant d'être purifiée une deuxième fois. Un dosage

fluorimétrique de l'ADN a été réalisé (kit Quanti Picogreen DS DNA Assay, Life technologies) sur un Fluoroskan pour pouvoir normaliser les échantillons les uns par rapport aux autres. Ils ont ensuite été poolés afin d'obtenir la librairie de séquençage.

Avant le séquençage, la librairie a été quantifiée (kit KAPA Library Quantification, Cliniscience) et la concentration ajustée à 4 nM (Annexe 8).

3.4.2. Analyse des résultats de séquençage

Les critères de validation du run de séquençage ont été un pourcentage de cluster passant le filtre supérieur à 85% et un pourcentage de bases supérieures à Q30 supérieur à 78%.

Grâce aux index présents sur les segments d'intérêt, les données ont été démultiplexées et les séquences des deux reads (fastq R1 et R2) ont été attribuées à chaque patient correspondant. L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel VIDJIL et a permis de lister les différents réarrangements présents et le pourcentage de séquences présentant ces réarrangements pour chaque patient. Un exemple de résultat obtenu avec le logiciel VIDJIL est présenté en Annexe 10.

Enfin la productivité du réarrangement et le pourcentage d'homologie avec la séquence germinale pour les patients présentant un clone de LLC, ont été définis sur le site Ig-blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>).

On peut ainsi, connaître dans un même prélèvement s'il existe un ou plusieurs réarrangements clonaux et si ces réarrangements sont présents en proportions différentes parmi la population de lymphocytes B.

3.5. Résultats

3.5.1. Patients

56 patients ont été inclus pour un total de 58 prélèvements, le patient N°11 ayant été analysé deux fois à 30 mois d'intervalle (11a et 11b) et le patient N°50 ayant eu un prélèvement de sang et de moelle osseuse (50a et 50b).

Nous avons étudiés 13 prélèvements médullaires, 43 prélèvements sanguins et deux ponctions de liquide pleural.

Au cours de la période de l'étude, 2783 recherches de clonalité B ont été réalisées au laboratoire. Ceci a permis de mettre en évidence 803 LLC et MBL et 824 lymphomes. L'incidence des SLPC B avec plus d'un clone peut donc être évaluée à 3.4% des SLPC B totaux diagnostiqués dans notre laboratoire.

Au moment de la réalisation de l'immunophénotypage lymphocytaire les patients étudiés ont un âge moyen de 77 ans, avec un âge minimum de 51 ans et un âge maximum de 95 ans pour les hommes et un âge moyen de 74 ans, avec un âge minimum de 53 ans et un âge maximum de 93 ans pour les femmes. Il existe une prédominance masculine avec un sex ratio de 2.7.

Si nous étudions seulement les prélèvements comprenant au moins un clone de LLC, l'âge moyen des patients est de 77 ans avec un âge minimum de 51 ans et un âge maximum de 95 ans pour les hommes et un âge moyen de 74 ans avec un âge minimum de 53 ans et un âge maximum de 91 ans pour les femmes. Il y a toujours une prédominance masculine avec un sex ratio de 2.

Sur les 49 patients pour lesquels nous disposons des antécédents 18 étaient déjà suivis pour un lymphome ou un SLPC : 9 LLC, 3 maladies de Waldenström, 1 leucémie à tricholeucocytes, 1 lymphome du SNC, 1 lymphome du manteau, 1 leucémie à LGL, 1 lymphome lymphoplasmocytaire et 1 SLPC non classé. La mention de la coexistence de deux clones distincts n'a été retrouvée dans aucun des dossiers de ces patients.

3.5.2. Immunophénotypage

Les caractéristiques immunophénotypiques des patients sont présentées dans le Tableau 6.

L'analyse met en évidence 53 prélèvements dans lesquels nous retrouvons deux clones différents et 5 prélèvements en comprenant trois.

N°	Nature	Population N°1			Population N°2			Population N°3		
		phénotype	type	% des Ly. B	phénotype	type	% des Ly B	phénotype	type	% des Ly. B
1	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^d	LLC	87	FMC7+, CD79b ^d , CD20+, λ ^a	LZM	2			
2	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , Ig ⁰	LLC	60	CD79b+, κ ^a	non carac.	40			
3	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^a	LLC	94	CD23+, CD79b ^d , κ ^d	LLC	6			
4	MO	CD23+, CD79b+, κ ^d	non carac.	93	FMC7+, CD79b+, κ ^a	LZM	6			
5	MO	FMC7+, CD79b+, κ ^a	non carac.	63	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	LLC	37			
6	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^a	MBL	74	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^a	MBL	26			
7	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^a	LLC	91	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	LLC	9			
8	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^a	LLC	94	CD23+, CD5+ CD79b ^d , λ ^a	MBL	6			
9	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^a	MBL	72	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	28			
10	MO	CD23+, CD79b+, CD10+, λ ^a	LF	71	CD23+, FMC7+, CD79b+, κ ^d	non carac.	29			
11a	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	76	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^a	MBL	22			
11b	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	77	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^a	MBL	23	CD4+, CD158+	Sézary	47 (ly. tot.)
12	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^a	MBL	67	FMC7+, CD79b+, CD20+, κ ^a	lympho plasm.	14			
13	sang EDTA	CD23+, FMC7+, CD79b+, κ ^a	LZM	83	CD23+, CD5+, CD79b ^d , Ig ⁰	MBL	17			
14	sang EDTA	FMC7+, CD79b ^d , κ ^a	LF	65	CD79b ^d , CD20+, κ ^a	non carac.	35			
15	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^a	LLC	75	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^a	LLC	25			
16	sang EDTA	CD23+, CD79b ^d , κ ^d	LLC	75	FMC7+, CD79b+, κ ^a	LZM	25			
17	sang EDTA	CD79b+, κ ^a	lympho plasm.	65	CD23+, CD5+, CD79b ^d , Ig ⁰	MBL	16			
18	MO	CD23+, CD5+, FMC7+, CD79b ^d , λ ^a	non carac.	40	CD23+, CD5+, FMC7+, CD79b ^d , λ ^d	LLC	40	CD23+, CD79b ^d , λ ^d	LLC	8
19	sang EDTA	FMC7+, CD79b ^d , λ ^a	non carac.	58	FMC7+, CD79b ^d , κ ^a	non carac.	31	CD23+, CD5, FMC7+, CD79b ^d , Ig ⁰	LLC	11
20	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , CD10+ κ ^a	LLC	49	CD23+, FMC7+, CD79b ^d , κ ^d	non carac.	48			
21	MO	CD5+, FMC7+, CD79b+, λ ^a	LZM	47	CD79b+, λ ^d	non carac.	48			
22	liquide pleural	CD23+, CD5+, FMC7+, CD79b ^d , Ig ⁰	LBDGC	85	FMC7+, CD79+, κ ^a	non carac.	13			
23	sang EDTA	CD5+, CD79b+, CD20+, κ ^a	LM	73	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	LLC	27			
24	sang EDTA	CD5+, CD79b ^d , λ ^a	non carac.	50	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^a	LLC	40	CD5+, FMC7+, CD79b+, CD20+, λ ^a	manteau	6
25	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	81	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^a	MBL	11			
26	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	58	FMC7+, CD79b+, CD11+, CD25+, CD130+, κ ^a	tricho.	35			
27	sang EDTA	CD5+, FMC7+, CD79b+, CD20+, κ ^d	LM	74	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^d	MBL	23			
28	sang EDTA	CD23+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	52	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	48			
29	sang EDTA	CD23+, CD79b ^d , Ig ⁰	LLC	75	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	LLC	25			
30	MO	FMC7+, CD79b+, λ ^a	LZM	30	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	30			
31	sang EDTA	FMC7+, CD79b ^d , λ ^a	non carac.	61	FMC7+, CD79b+, κ ^d	non carac.	39			
32	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	LLC	93	CD23+, FMC7+, CD79b ^d , CD11+, CD25+, CD103+, κ ^a	tricho.	5			
33	sang EDTA	CD79b+, κ ^a	LZM	55	CD5+, FMC7+, CD79b+, κ ^a	LZM	40			
34	sang EDTA	CD5+, FMC7+, CD79b+, CD22+, λ ^a	LZM	60	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^a	LLC	17			
35	sang EDTA	FMC7+, CD79b+, κ ^a	LZM	93	CD23+, FMC7+, CD79b ^d , λ ^a	non carac.	7			
36	sang EDTA	CD23+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	86	FMC7+, CD79b+, κ ^a	LZM	14			
37	sang EDTA	CD23+, FMC7+, CD79b+, λ ^a	non carac.	69	FMC7+, CD79b+, κ ^d	non carac.	31			
38	sang EDTA	CD79b ^d , CD43+, λ ^d	LBDGC	85	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^d	MBL	11			

N°	Nature	Population N°1			Population N°2			Population N°3		
		phénotype	type	% des Ly. B	phénotype	type	% des Ly B	phénotype	type	% des Ly. B
39	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ⁺	LLC	82	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ⁺	LLC	18			
40	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ^d	LLC	46	CD23+, CD5+, CD79b ^d , Ig ⁰	LLC	32			
41	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	89	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ⁺	MBL	7			
42	pleural	CD5+, FMC7+, CD79b+, CD43+, CD20+, CD22+, κ ⁺	LM	52	CD5+, CD79b+, CD20+, CD22+, κ ⁺	LM	32			
43	sang EDTA	CD5+, FMC7+, CD79b+, κ ^d	LM	95	CD23+, CD5+, FMC7+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	2			
44	MO	CD5+, FMC7+, CD79+, κ ⁺	LM	52	CD23+, FMC7+, CD79+, κ ^d	lympho plasm.	34	CD23+, CD5+, CD79b ^d , λ ⁺	MBL	5
45	MO	FMC7+, CD79b+, κ ⁺	LZM	80	FMC7+, CD79b+, κ ⁺	LF	20			
46	MO	FMC7+, CD79b ^d , Ig ⁰	LZM	88	CD23+, CD5+, FMC7+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	11			
47	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	LLC	66	FMC7+, CD79b ^d , κ ⁺	non carac.	34			
48	sang EDTA	FMC7+, CD79b ^d , κ ^d	non carac.	63	CD5+, FMC7+, CD79b ^d , κ ^d	non carac.	37			
49	MO	CD5+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	60	CD23+, CD5+, CD79b+, κ ⁺	non carac.	40			
50 a	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , Ig ⁰	MBL	96	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	4			
50 b	MO	CD23+, CD5+, CD79b ^d , Ig ⁰	MBL	40	CD23+, CD5+, CD79b+, κ ^d	MBL	12			
51	MO	CD79b+, CD103+, CD11+, CD25+, CD103+, λ ⁺	tricho.	61	CD23+, FMC7+, CD79b ^d , λ ⁺	non carac.	10			
52	sang EDTA	FMC7+, CD79b ^d , CD10+, λ ^d	LF	29	CD5+, FMC7+, CD79b ^d , κ ⁺	non carac.	4			
53	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , Ig ⁰	LLC	94	CD5+, FMC7+, CD79b+, λ ⁺	non carac.	1			
54	sang EDTA	CD5+, FMC7+, CD79b+, κ ^d	LM	90	CD23+, FMC7+, CD79b+, κ ^d	non carac.	10			
55	MO	FMC7+, CD79b ^d , λ ⁺	LZM	81	CD5+, CD79b ^d , κ ^d	MBL	8			
56	sang EDTA	CD23+, CD5+, CD79b ^d , κ ⁺	LLC	91	CD5+, CD79b ^d , κ ⁺	non carac.	4			

Tableau 6 : Profils immunophénotypiques

Ly. : lymphocytes ; *tricho.* : leucémie à tricholeucocytes ; *lymphoplasmo.* : lymphome lymphoplasmocytaire ; *LF* : lymphome folliculaire ; *LM* : lymphome du manteau ; *LZM* : lymphome de la zone marginale ; *LLC* : leucémie lymphoïde chronique.

^d : expression diminuée du marqueur ; ⁰ : absence d'immunoglobuline de surface

Parmi les différents types de SLPC retrouvés nous dénombrons 32 clones de MBL, 28 clones de LLC, 14 de LZM, 8 de LM, 4 de LF, 3 de lymphome lymphoplasmocytaire, 3 de leucémie à tricholeucocytes, 2 de LBDGC, 1 lymphome de Sezary et 26 clones non caractérisés.

Parmi les clones non caractérisés nous pouvons distinguer trois groupes selon l'expression de CD5 et CD10 (le CD10 n'a pas été réalisé chez 4 patients) :

- 7 patients CD5+, CD10- ;
- 1 patients CD5-, CD10+ ;
- et 14 patients CD5-, CD10-.

Pour classer les clones de LLC nous avons utilisé les critères donnés par l'International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia de 2008 (clone B > 5 G/l dans le sang périphérique).⁵⁹ Sous cette appellation nous regroupons également les lymphomes lymphocytiques. Ne pouvant attribuer la présence d'adénopathie ou de splénomégalie à un des deux clones dans notre étude nous avons utilisé le terme MBL pour les clones inférieurs à 5 G/l et possédant un phénotype de LLC.

Ces clones sont répartis selon différentes associations résumées dans la Figure 9.

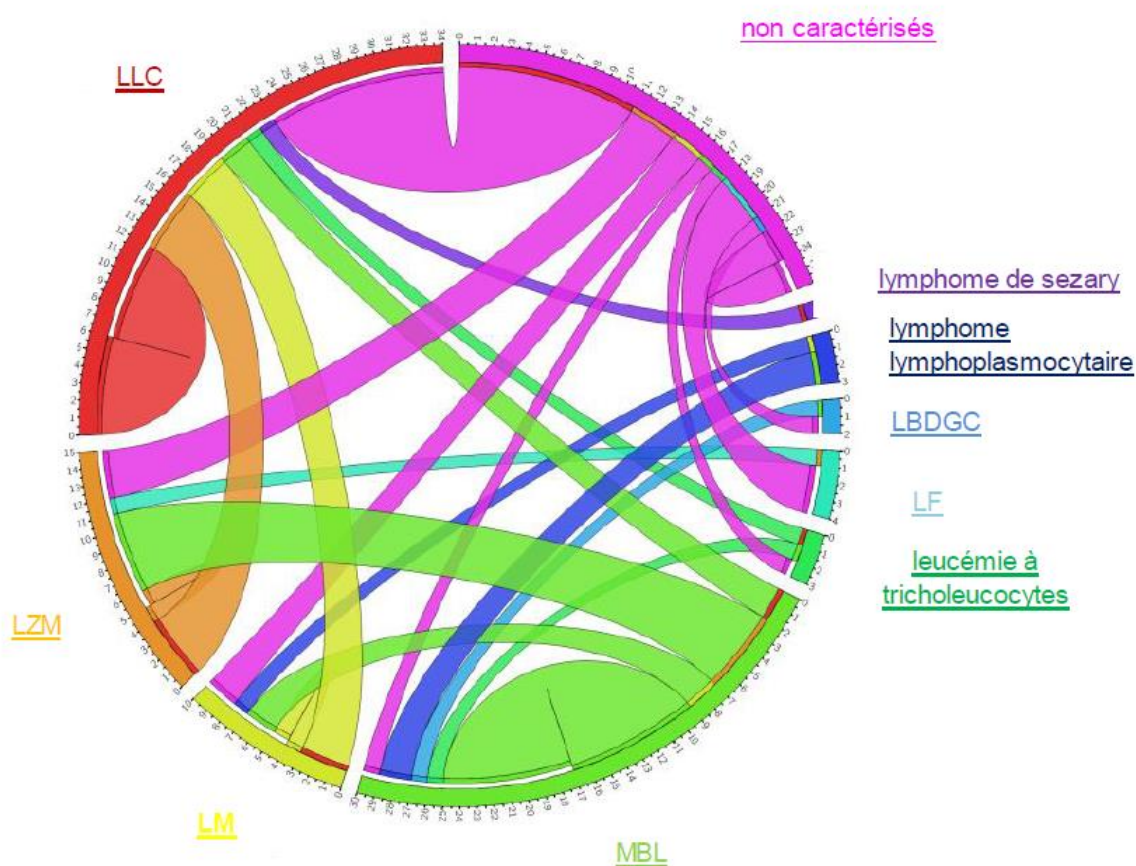


Figure 9 : Diagramme des associations lymphomateuses rencontrées

Les ratios Kappa /Lambda calculés sont résumés dans le Tableau 7. Ce ratio est diminué dans 11 prélèvements, normal dans 15 et augmenté dans 32.

N°	Ratio κ/λ	N°	Ratio κ/λ
1	0,04	29	74
2	39	30	2
3	0,06	31	1,6
4	249	32	165
5	13,6	33	332
6	2,8	34	0,4
7	10	35	13
8	18	36	43
9	0,4	37	0,5
10	0,4	38	0,005
11a	4	39	4
11b	3	40	0,03
12	0,2	41	10
13	5	42	249
14	194	43	49
15	0,3	44	6
16	29	45	89
17	4	46	82
18	0,009	47	499
19	0,5	48	199
20	42	49	57
21	0,06	50a	5
22	57	50b	0,25
23	199	51	0,01
24	0,7	52	0,1
25	7	53	1
26	11	54	999
27	3	55	0,2
28	95	56	165

Tableau 7 : Ratio kappa / lambda

en noir : ratio normal

en rouge : ratio augmenté

en vert : ratio diminué

Le marqueur qui permet le plus souvent de différencier les clones est la chaîne légère de l'immunoglobuline de surface qui diffère dans 32 prélèvements sur 58 analysés (55%), suivi par FMC7 (27 prélèvements soit 47%), CD79b (25 prélèvements soit 43%), CD23 et CD5 (24 prélèvements soit 41%) et CD10 (5 prélèvements pour 47 testés soit 11%).

3.5.3. Données biologiques et cliniques

Les caractéristiques biologiques et cliniques des patients, au moment de la réalisation de l'immunophénotypage, ainsi que le traitement initié lorsque cette information a été retrouvée, sont présentés dans le tableau situé en Annexe 11.

Hémoglobine :

La valeur moyenne de l'hémoglobine est de 12.3 g/dl, une anémie est observée chez 26 patients (49%).

Pour les patients chez qui nous avons retrouvé au moins un clone de LLC la valeur moyenne de l'hémoglobine est de 13.0 g/dl, une anémie est observée chez 9 patients (53%).

Numération plaquettaire :

La numération plaquettaire moyenne observée est de 195 G/l et une thrombopénie est présente chez 17 patients (31%).

Pour les patients chez qui nous avons retrouvé au moins un clone de LLC la numération plaquettaire moyenne observée est de 186 G/l et une thrombopénie est présente chez 5 patients (28%).

Taux de lymphocytes :

Le taux de lymphocytes sanguin moyen (lymphocytes normaux + cellules lymphomateuses) est de 5.9 G/l. Ce taux est supérieur à 5 G/l chez 27 patients (48%).

Pour les patients chez qui nous avons retrouvé au moins un clone de LLC. Le taux de lymphocytes sanguin moyen est de 20.9 G/l.

LDH :

La valeur moyenne des LDH est de 240 UI/l pour des valeurs normales comprises entre 135 et 225 UI/l, et l'on retrouve 11 patients (32%) avec des LDH augmentées.

Pour les patients chez qui nous avons retrouvé au moins un clone de LLC la valeur moyenne des LDH est de 202 UI/l et nous retrouvons 2 patients (17%) avec des LDH augmentées.

ASAT et ALAT :

Les ASAT (TGO) ont une valeur moyenne de 29 UI/l et sont augmentées chez 4 patients (10%) sans toutefois dépasser une valeur supérieure à deux fois la normale. La valeur moyenne des ALAT (TGP) est de 25 UI/l, on observe une augmentation chez 6 patients (15%) qui ne dépassera également pas deux fois la normale.

Pour les patients chez qui nous avons retrouvé au moins un clone de LLC les ASAT (TGO) ont une valeur moyenne de 21 UI/l et ne sont augmentées chez aucun patient. La valeur moyenne des ALAT (TGP) est de 26 UI/l, on observe une augmentation chez 2 patients (14%).

Electrophorèse des protéines :

L'électrophorèse des protéines révèle des anomalies de la fraction gamma ou la présence de pic chez 29 patients (74%), l'exploration de ces anomalies en immunofixation révélera la présence d'au moins une immunoglobuline monoclonale chez 16 patients (33%).

Pour les patients chez qui nous avons retrouvé au moins un clone de LLC l'électrophorèse des protéines révèle des anomalies chez 10 patients (67%) dont la présence d'au moins un pic chez 2 patients (13%). L'immunofixation révélera la présence d'au moins une immunoglobuline monoclonale chez 2 patients (13%).

Stade :

Pour les 16 patients chez qui nous retrouvons un clone de LLC et pour lesquels nous disposons du stade, 11 sont classés au stade A de la classification de Binet, 1 au stade B et 4 au stade C.

Pour les 24 patients présentant des clones non LLC et pour lesquels les renseignements cliniques ont pu être retrouvés 12 sont au stade I de la classification de Ann Arbor, 2 au stade II, 7 au stade III et 3 au stade IV.

Les caractéristiques cliniques et biologiques des patients présentant au moins un clone de LLC comparées à la littérature sont présentées dans le Tableau 8.

	Etude N=21	Sanchez et al. (Blood, 2003)		
		LLC+ LLC N=18	LLC + non- LLC N=15	LLC monoclonale N=366
Age moyen	77(H)/74(F)	66	77	71
Stade Binet A %	69	69	67	81
Stade Binet B ou C %	31	31	33	19
Adénopathies %	44	56	33	36
Hépatomégalie %	13	12	7	13
Splénomégalie %	38	37	27	16
Hb g/dl	13.0	13.2	12.2	13.8
PQ G/l	186	154	178	185
Ly G/l	20.9	17.7	17.9	32.8
LDH U/l	202	343	1357	419

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des caractéristiques cliniques et biologiques des patients présentant au moins un clone de LLC et comparaison à la littérature

source : M.-L. Sanchez, "Incidence and Clinicobiologic Characteristics of Leukemic B-cell Chronic Lymphoproliferative Disorders with More Than One B-cell Clone," Blood 102, no. 8 (October 15, 2003): 2994–3002.

3.5.4. Caryotype et FISH

Les résultats de l'étude du caryotype sont présentés en Annexe 12.

19 patients ont été analysés. La formule du caryotype est normale dans 4 prélèvements et 15 d'entre eux ont révélé des anomalies.

La présence de plusieurs clones n'a été mise en évidence que dans deux prélèvements :

On détecte deux clones dans le prélèvement N°24 :

- un clone majoritaire de 16 mitoses comportant une délétion 7q compatible avec un lymphome de la zone marginale ;

- un clone de 5 mitoses comportant une trisomie 12 isolée dans 3 mitoses et associée à une délétion 11q/ATM- dans 2 mitoses, compatible avec une LLC.

Et on détecte 4 clones dans le prélèvement N°49 comportant en commun :

- une trisomie 4 ;
- une translocation t(3;6) déséquilibrée générant une trisomie 3q partielle ;
- un remaniement d'un chromosome 8 générant une trisomie 8q partielle.

Variations avec :

- remaniement d'un chromosome 21 dans 4 mitoses ;
- un remaniement d'un chromosome 17 générant un 17p dans 3 mitoses associé à un remaniement d'un chromosome 19 et à un chromosome marqueur dans 3 mitoses ;
- perte d'un chromosome 4 et remaniement d'un chromosome 12 dans 2 mitoses.

Il s'agit d'un caryotype complexe compatible avec un Waldenström.

Si l'on s'intéresse aux 7 patients présentant au moins un clone de LLC pour lesquels nous disposons du caryotype ils peuvent être répartis en 6 catégories selon le modèle proposé par Döhner et al., en 2000 (Tableau 9).⁶⁰

Caryotype	Nombre de patients (%)
délétion 17p	1 (14)
délétion 11q	2 (29)
trisomie 12q	1 (14)
caryotype sans anomalie	0
délétion 13q	2 (29)
anomalies multiples	1 (14)

Tableau 9 : Classification des patients selon les anomalies chromosomiques d'après les propositions de Döhner et al.

Ces catégories ont été définies ainsi : patients avec une délétion 17p ; patients avec une délétion 11q mais sans délétion 17p, patients avec une trisomie 12 mais sans délétion 17p ni délétion 11q, patient avec un caryotype sans anomalie et enfin patient avec une délétion 13q comme seule anomalie.

source : Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia," New England Journal of Medicine 343, no. 26 (2000): 1910–1916.

La recherche des délétions des gènes *ATM* et *TP53* en FISH chez les patients présentant au moins un clone de LLC est présentée dans le Tableau 10.

N°	Résultat
3	Présence d'une délétion <i>ATM</i> Absence de délétion <i>TP53</i>
18	Absence de délétion <i>ATM</i> Présence d'une délétion <i>TP53</i>
24	Présence d'une délétion <i>ATM</i> Présence d'une délétion <i>TP53</i>
32	Absence de délétion <i>ATM</i> Absence de délétion <i>TP53</i>
39	Absence de délétion <i>ATM</i> Absence de délétion <i>TP53</i>
40	Absence de délétion <i>ATM</i> Absence de délétion <i>TP53</i>
53	Absence de délétion <i>ATM</i> Absence de délétion <i>TP53</i>

Tableau 10 : Recherche de délétion des gènes *ATM* et *TP53*

3.5.5. NGS

Les résultats de l'analyse NGS sont présentés dans le Tableau 11.

24 prélèvements ont été analysés. Pour 3 d'entre eux la recherche de clonalité est négative. On retrouve un réarrangement clonal dans 4 prélèvements, 2 réarrangements dans 13 prélèvements, 3 réarrangements dans 3 prélèvements et 4 dans 1 prélèvement.

N°	Réarrangement				Réarrangement				Réarrangement				Réarrangement				Pourcentage en CMF % (des Ly. B)			Nb. de marqueurs qui diffèrent en CMF
				%				%						%	Pop. N°1	Pop. N°2	Pop. N°3			
3	VH1-69*01 DH3-3*01 JH6*02	34	P	NM	VH1-18*01 DH5-24*01 JH3*02	30	NP	NM	VH3-7*01 DH3-10*01 JH4*02	7	P	M		94	6		2			
11b	VH4-59*01 DH6-6*01 JH6*02	83	P	M										77	23		1			
12	VH3-23*01 DH3-10*01 JH1*01	74	P	M										67	14		4			
23	VH3-23*01 DH2-15*01 JH4*02	67	P	M	VH4-34*01 DH2-15*01 JH4*02	3	P	M						73	27		2			
24	VH7-4-1*04 DH2-15*01 JH6*02	33	NP	M	VH1-69*01 DH3-3*01 JH5*02	28	P	NM	VH3-73	6				50	40	6	4			
25	VH3-30*03 DH3-10*01 JH4*02	39	NP	M	VH5-51*01 DH5-24*01 JH6*02	32	P	M						81	11		1			
26	VH3-72*01 DH2-8*01 JH6*02	56	P	M	VH4-59*01 DH5-24*01 JH2*01	18	P	M						58	35		4			
27	VH3-15*07 DH1-1*01 JH4*03	34	P	M	VH4-30-2*04 DH2-2*01 JH5*02	43	P	M						74	23		3			
28	VH1-69*01 DH2-2*01 JH6*02	49	P	NM	VH1-69*01 DH2-2*01 JH6*02	20	P	NM						52	48		1			
29	VH5-51*01 DH6-19*01 JH4*02	39	P	M	VH1-8*01 DH6-13*01 JH6*02	14	P	NM	VH4-34*01 DH3-3*01 JH6*02	12	NP	NM	VH3-49*02 DH3-22*01 JH5*02	8	P	NM	75	25	2	
30	VH3-23*01/DH6-19*01/JH4*02	35	P	M	VH3-30*02/DH6-19*01/JH4*02	6	P	M						30	30		5			
31	VH2-70	15												61	39		1			
32	VH2-5*02 DH2-2*01 JH4*02	69	P	M	VH3-30*02 DH3-10*01 JH4*02	7	P	M						93	5		2			
36	VH4-39*01 DH6-19*01 JH4*02	44	P	NM	VH4-34*01 DH2-2*01 JH6*02	6	P	M						86	14		3			
37	VH5-10-1*01 DH1-26*01 JH6*02	45	P	M	VH5-51*01 DH5-24*01 JH6*02	5	P	M	VH3-30*03 DH3-10*01 JH4*02	5	NP	M		69	31		1			
40	VH4-61*03 DH2-15*01 JH4*02	44	P	M	VH1-69*01 DH2-15*01 JH2*01	20	P	NM						46	32		2			
41	VH3-73*01 DH3-10*01 JH5*02	15	P	NM	VH3-33*01 DH4-11*01 JH6*02	3	P	M						89	7		1			
44	non clonal												52	34	5	4				
45	non clonal												80	20		1				
46	VH1-18*01 JH3*02	44	NP	NM	VH4-39*01 DH5-18*01 JH4*02	33	P	M						88	11		3			
47	VH3-48*03 DH1-26*01 JH3*02	86	P	M	VH3-21*01 DH6-13*01 JH5*02	6	P	M						66	34		3			
53	VH1-18*01 DH3-3*01 JH6*02	94	P	M										94	1		4			
54	VH3-30*03 DH6-13*01 JH4*01	53	NP	M	VH3-23*01 DH3-16*01 JH4*02	40	P	M						90	10		2			
55	non clonal												81	8		3				

Tableau 11 : Réarrangements retrouvés en NGS : pourcentage, productivité, statut mutationnel et comparaison aux résultats de l'immunophénotypage

P : productif ; NP : non productif ; M : muté ; NM : non muté ; Ly. B : lymphocytes B

le nombre de marqueurs qui diffèrent en CMF est calculé sur l'expression des 5 marqueurs du score de Matutes et sur celle de CD10 (excepté pour le patient N°11b pour lequel CD10 n'a pas été réalisé)

Pour quatre patients, l'analyse NGS n'a retrouvé qu'un seul réarrangement *IGH*. Ceci serait, pour ces échantillons, en faveur de l'évolution clonale d'un clone primitif due à des mutations somatiques. Cela serait notamment cohérent avec les résultats de l'immunophénotypage pour les patients N°11b et 31 pour lesquels les clones ne présentaient qu'un seul marqueur différent en cytométrie en flux (différence d'expression parmi les 5 marqueurs du score de Matutes et CD10). Cela est moins clair avec les patients N° 12 et 53 qui présentaient chacun 4 marqueurs différents. Ces deux patients correspondent à des échantillons dans lesquels la proportion du deuxième clone en CMF est beaucoup plus faible que celle du clone majoritaire (14 et 1%), il est donc possible que tous les réarrangements n'aient pas été détectés.

Un séquençage sur les populations clonales triées pourrait confirmer ces résultats. Il serait également possible d'analyser s'il existe plusieurs réarrangements des locus *IGK* et/ou *IGL* en parallèle d'un seul réarrangement *IGH*.

Pour 17 patients l'analyse a révélé la présence de plusieurs réarrangements *IGH*.

Pour les patients N°25, 46 et 54 les pourcentages des deux réarrangements trouvés sont du même ordre et se composent d'un réarrangement productif associé à un réarrangement non productif. Ceci serait donc en faveur d'une évolution clonale même si les patients N°46 et 54 présentent respectivement 3 et 2 marqueurs différents en CMF.

Tous les autres patients présentent plusieurs réarrangements productifs.

Pour les patients N° 23, 26, 30, 32, 36, 40 et 47 les pourcentages des deux réarrangements trouvés sont très différents. Ces observations seraient donc plutôt en faveur de la présence de deux clones différents d'origine clonale différente. Ceci est cohérent avec les observations de l'immunophénotypage qui retrouve également deux clones à des pourcentages différents et qui diffèrent par au moins deux marqueurs. Pour le patient N°30 les proportions des deux clones trouvés en NGS et en CMF ne sont pas cohérentes cependant les deux clones se différencient par l'expression de 5 marqueurs en CMF.

La question se pose pour les patients N°28 et 41 qui présentent deux réarrangements productifs dans des proportions très différentes mais avec un seul marqueur qui diffère (CD5 et Ig de surface respectivement).

La question se pose également pour le patient N°27 qui présente deux réarrangements productifs dans les mêmes proportions et 3 marqueurs qui diffèrent en CMF. Ceci serait plutôt en faveur de la présence de deux clones.

Les patients N°3, 24 et 37 présentent deux réarrangements productif et non productif dans les mêmes proportions associés à un réarrangement productif dans une proportion différente. Ceci traduit la présence de deux clones. Cela a notamment été confirmé par le caryotype pour le patient N°24 chez qui on retrouve deux clones présentant des anomalies différentes.

Le patient N°29 présente 3 réarrangements productifs qui seraient donc en faveur de la présence de 3 clones associés à un réarrangement non productif pour un de ces clones. L'immunophénotypage n'en retrouvait cependant que deux.

3.5.6. Stratégie thérapeutique

Pour les patients pour lesquels les renseignements cliniques ont pu être retrouvés, une simple surveillance a été décidée pour 24 d'entre eux. Parmi ceux-ci, le patient N°5 sera traité par Rituximab trois ans après le diagnostic suite à une majoration de la thrombopénie, le patient N°8 sera finalement traité par Chloraminophène 36 mois après le diagnostic, le patient N°21 bénéficiera d'un traitement par R-CD devant une altération de l'état général et l'apparition d'adénopathies médiastinales à 10 mois et le patient N°23 recevra une chimiothérapie R-CHOP suite à une majoration de la neutropénie à 12 mois.

Une prise en charge thérapeutique a été décidée pour 22 patients.

Un traitement par Prednisone a été instauré pour un patient présentant une leucémie à tricholeucocytes associée à lymphome non caractérisé, on a eu recours à une chimiothérapie pour 20 patients et une demande en ATU d'Ibrutinib a été faite pour un patient.

A notre connaissance trois patients sont décédés avant la fin de l'étude. Le patient N°9 est décédé des suites des complications d'une anémie aigue, le patient N°33 suite à un syndrome de défaillance multi viscérale sur syndrome de lyse tumorale associé à des épanchements pleuraux abondants et le patient N°42 d'une acidose lactique suite à un envahissement du tube digestif, de l'estomac et du duodénum.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au choix de la chimiothérapie pour les patients pour lesquels deux clones avaient clairement été identifiés.

Pour le patient N°12 qui était suivi pour une LLC à manifestation rénale et pour lequel nous retrouvons un clone MBL majoritaire et un clone de lymphome lymphoplasmocytaire on a utilisé une chimiothérapie par R-CD qui est le traitement de première ligne pour le lymphome lymphoplasmocytaire et qui est également utilisé en première ligne pour le traitement de la LLC.

Cette chimiothérapie a également été utilisée pour traiter le patient N°44 suivi pour maladie de Waldenström et chez qui nous avons mis en évidence un clone de LM majoritaire, un clone de lymphome lymphoplasmocytaire et un clone MBL minoritaire.

Pour le patient N°23 chez qui nous avons mis en évidence un clone de LM majoritaire et un clone de LLC, après 12 mois de surveillance et devant une majoration de la neutropénie, on

a utilisé 8 cycles de R-CHOP qui est le traitement de référence pour les patients atteints de LM de plus de 65 ans.

Pour le patient N°24 chez qui nous retrouvons un clone non caractérisé majoritaire, un clone de LLC et un clone de LM minoritaire on a utilisé une chimiothérapie par R-Bendamustine qui est la chimiothérapie de référence chez le patient atteint de LM (insuffisant cardiaque).

Cela a également été utilisé pour le patient N°27 chez qui nous retrouvons un clone de LM majoritaire et un clone MBL.

Pour le patient N°26 chez qui nous retrouvons un clone MBL majoritaire et un clone de leucémie à tricholeucocytes et pour le patient N°32 chez qui nous retrouvons un clone de LLC majoritaire et un clone de leucémie à tricholeucocytes une chimiothérapie par Cladribine et par Pentostatine ont respectivement été utilisées. Ces deux molécules sont les chimiothérapies de référence pour traiter les leucémies à tricholeucocytes.

Pour le patient N°36 chez qui nous avons mis en évidence un clone MBL majoritaire et un clone de LZM nous avons utilisé 6 cycles de R-Bendamustine qui est utilisée pour le traitement du LZM.

Pour le patient N°43 suivi pour un lymphome du SNC et chez qui nous avons retrouvé un clone de LM majoritaire et un clone MBL on a utilisé le Témazolomide associé au Rituximab qui est un traitement du LBDGC cérébral.

Enfin, pour le patient N°45 chez qui nous avons retrouvé un clone de LZM majoritaire et un clone de LF on a utilisé 8 cycles de R-CVP qui peut être utilisé en première ligne dans les deux cas.

3.6. Discussion

L'incidence des SLPC B avec plus d'un clone a été estimée à 3.4% des lymphomes, LLC et MBL dans notre étude. Ce chiffre est concordant avec les résultats de la littérature.

Plusieurs équipes ont réalisé des études de cohorte. Les incidences observées vont de 1.4% pour Kern et al., (76 patients pour 5523 SLPC) ⁶¹ à 4.8 % pour Sanchez et al., (53 patients) ⁶² en passant par 3.8% pour Lazarian et al., (44 patients pour 1152 SLPC) ⁶³ ou encore 3.9% pour Perkovic et al., (16 patients pour 413 SLPC). ⁶⁴

La majorité des clones retrouvés sont des clones de LLC (29%) et des clones MBL (34%). Cela n'est pas surprenant, la LLC étant le SLPC le plus fréquent.

Nous remarquons que dans 26% des cas le ratio Kappa/Lambda est normal (entre 0.3 et 4). L'utilisation de ce ratio comme critère de clonalité lorsqu'il est diminué ou augmenté ⁶⁵ peut donc conduire à méconnaître un SLPC B biclonal. Ceci s'explique par le fait que tous les patients pour lesquels le ratio est normal présentent des clones qui ont une chaîne légère différente ou bien une absence d'immunoglobuline de surface pour l'un des deux clones. Ce ratio ne doit donc pas être utilisé seul dans la recherche d'un SLPC B. Tous les marqueurs utilisés pour calculer le score de Matutes doivent être analysés. Dans un seul de nos prélèvements, aucun de ces marqueurs ne différait entre les 2 clones, seul le niveau d'expression des chaînes légères ou l'expression de CD10 permettaient de les différencier.

Le type de chaîne légère de l'immunoglobuline est le paramètre qui permet le plus souvent de distinguer les deux clones. La mise en évidence d'une expression identique des autres marqueurs pour toutes les cellules exprimant la même chaîne légère permet alors de suspecter un SLPC et la différence d'expression de ces marqueurs notamment de FMC7 permet alors d'évoquer la présence de deux populations clonales. Lorsque la chaîne légère est identique il faut porter une attention particulière au niveau d'expression de celle-ci, légère ou forte.

La mise en évidence du processus de clonalité et de la présence de deux populations n'est ainsi pas toujours aisée.

Dû au faible nombre de patients dans chaque groupe de SLPC non LLC, seuls les résultats biologiques et cliniques des patients présentant au moins un clone de LLC pourront être discutés.

Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre l'âge moyen au diagnostic des patients chez qui nous retrouvons un clone de LLC associé à un autre clone et l'âge médian donné par le réseau Francim en 2012, que ce soit pour les hommes ou pour les femmes.

Hommes et femmes confondus, lorsque nous comparons cette moyenne dans notre étude (76 ans) à celle trouvée par Sanchez et al.,⁶² nous ne retrouvons pas non plus de différence significative.

Au moment de la réalisation de l'immunophénotypage, 69 % des patients pouvaient être classés dans le stade A de la classification de Binet. Ce pourcentage n'est pas significativement différent de l'étude de Sanchez et al.,⁶² ou de celui donné par Binet dans sa proposition de classification.³⁸

Lorsque nous comparons la présence d'adénopathie, de splénomégalie ou d'hépatomégalie à l'étude de Sanchez et al.,⁶² nous ne retrouvons pas non plus de différence significative.

Lorsque nous comparons les données biologiques toujours à cette même étude nous observons que les patients possédant plus d'un clone ont des LDH significativement plus faibles que ceux qui n'en ont qu'un seul ($p < 0.01$). Nous n'observons en revanche pas de différence significative pour la valeur de l'hémoglobine, la numération plaquettaire et la numération des lymphocytes.

Ces résultats diffèrent quelque peu de la littérature. Dans l'étude de Sanchez et al.,⁶² les patients avec un clone de LLC associé à au moins un autre clone (LLC ou non LLC) présentaient plus souvent une splénomégalie que les patients avec un seul clone de LLC ($p = 0.02$). Cependant le taux de survie était identique dans les deux groupes. Les patients présentant un clone de LLC associé à un clone non LLC étaient plus âgés ($p = 0.05$) et nécessitaient un recours au traitement dans les 18 mois plus fréquents ($p = 0.03$) que les patients présentant une LLC monoclonale ou deux clones de LLC.

Dans l'étude de Kern et al.,⁶¹ les patients présentant un clone de LLC associé à au moins un autre clone de SLPC ont une médiane de survie sans traitement plus courte, mais non significative, que ceux qui n'ont qu'un seul clone de LLC (67.3 mois vs 104.9 mois, $p = 0.08$).

Döhner et al.,⁶⁰ ont analysé en FISH les prélèvements sanguins de 325 patients avec une LLC et ont corrélé leurs résultats aux données cliniques. Des anomalies chromosomiques ont été détectées chez 268 patients (82%). Les anomalies les plus fréquemment retrouvées étaient la délétion 13q (55%), la délétion 11q (18%), la trisomie 12q (16%), la délétion 17p (7%) et la délétion 6q (6%).

Le pronostic défavorable, par ordre décroissant, est marqué par la délétion 17p, puis par la délétion 11q, la trisomie 12q et un caryotype diploïde normal. En comparaison, les patients avec une délétion 13q comme seule anomalie ont un meilleur pronostic. La médiane de

survie globale pour ces cinq groupes était de 32, 79, 114, 111 et 133 mois et la médiane de survie sans traitement était de 9, 13, 33, 49 et 92 mois, respectivement.

Le faible nombre de patients analysés dans notre étude ne permet pas de réaliser une comparaison avec ces résultats. Cependant la tendance ne semble pas être différente, il ne se dégage pas d'augmentation de la fréquence d'anomalies qui pourraient être associées à un plus mauvais pronostic. Comme dans l'étude de Döhner et al., les anomalies les plus fréquemment retrouvées sont les délétions 13q, associée à un meilleur pronostic, et 11q.

Les anomalies des gènes *TP53* et *ATM* ont été décrites dans 4 à 15% et 9 à 12% des cas de LLC respectivement.^{66, 67}

Dans notre étude une délétion du gène *TP53* est retrouvée chez 2 patients (29%) et une délétion du gène *ATM* chez 2 patients également (29%). Ces résultats ne semblent pas différer des chiffres retrouvés dans la littérature cependant cela est à nuancer par le faible nombre de patients dans notre étude.

Hamblin et al.,⁶⁸ ont séquencé les gènes *IGVH* de 84 patients souffrant de LLC. 45.2% d'entre eux avait un statut non muté alors que 54.8% d'entre eux avaient un statut muté, associé à un meilleur pronostic.

L'analyse en NGS des réarrangements a été effectuée chez 8 patients chez qui nous avons retrouvé 11 clones de LLC. Nous dénombrons 7 séquences mutées (63.6%) et 4 non mutées (36.4%). Ces résultats ne diffèrent pas de ceux trouvés par Hamblin et al.,⁶⁸ et ne mettent ainsi pas évidence de pronostic plus péjoratif pour nos patients de ce point de vue.

La relation clonale entre deux populations peut être étudiée grâce à l'étude du réarrangement des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (*IGH*) car chaque lymphocyte possède une immunoglobuline unique qui reste stable au cours de toutes les divisions cellulaires.⁶⁹

Dans les cellules B normales ou dans les lymphocytoses polyclonales il y a une diversité importante des réarrangements *IGH* de telle sorte qu'un même réarrangement ne sera pas retrouvé dans plus de 1 à 2 % des lymphocytes. La présence d'un réarrangement retrouvé à plus de 2 % traduit un processus clonal.

Dans notre étude nous avons choisi d'étudier les réarrangements *IGH* par séquençage nouvelle génération. En effet le séquençage Sanger classiquement utilisé dans le laboratoire n'est pas adapté à l'étude d'échantillons bialléliques ou contenant plus d'un clone. Avec cette technique la différenciation des deux séquences et leur quantification est difficile et devient impossible lorsque l'on dépasse le nombre de trois séquences.

Pour trois patients, l'analyse NGS n'a pas permis de retrouver un réarrangement *IGH* surreprésenté, remettant ainsi en cause la notion de clonalité pourtant mise en évidence à l'immunophénotypage lymphocytaire.

Ceci pourrait s'expliquer par certaines limites de la technique. Les amorces utilisées pour encadrer la séquence d'intérêt se situent entre VH (FR2) et JH.⁷⁰ Les deux séquences obtenues sont de 150 pdb et ne se chevaucheront donc que si la distance entre les deux segments est inférieure à 300 pdb. Si le réarrangement a généré une séquence comprenant plus de 300 pdb il est possible que celui ne soit alors pas détecté par cette technique. Ce phénomène théorique n'a cependant pas été observé dans l'expérience du laboratoire.

Il faut de plus noter que pour les patients N° 11b, 25, 31 et 46 les deux populations qui semblent dériver du même clone ne portent pas la même chaîne légère. Cela impliquerait que l'évènement oncogénique à l'origine des deux clones ait eu lieu après le réarrangement du gène des chaînes lourdes mais avant celui des chaînes légères. Bien que théoriquement envisageable ce phénomène a peu été décrit dans la littérature.⁷¹

Nos observations supposent de plus le respect du phénomène d'exclusion allélique.

En effet, la présence de plusieurs réarrangements *IGH* productifs a été décrite dans des populations de LLC.⁷² La détection de deux réarrangements *IGH* productifs peut être alors expliquée par la présence de deux réarrangements ayant eu lieu sur un des deux allèles de deux clones différents ou par la présence de deux réarrangements ayant eu lieu sur les deux allèles d'un même clone.

La règle de l'exclusion allélique permet normalement de garantir que chaque cellule ne possède qu'un seul réarrangement *IGH* productif. Si la première tentative de réarrangement échoue alors seulement le deuxième sera réarrangé, si le réarrangement du second allèle échoue à son tour le lymphocyte entre en apoptose.

Cependant des études suggèrent que des cellules de LLC peuvent ne pas suivre cette règle et deux réarrangements productifs *IGH* peuvent ainsi être retrouvés dans un même clone suite à un phénomène de remplacement VH.^{73, 74} Pour d'autres équipes la présence de deux réarrangements *IGH* productifs traduit bien la présence de plusieurs clones indépendants comme avait pu le suggérer la présence de deux populations cellulaires de phénotypes différents à l'immunophénotypage lymphocytaire.⁷⁵

Dans l'étude de Kern et al.,⁶¹ la présence de deux réarrangements était plus fréquente dans les prélèvements biconaux que dans les prélèvements monoclonaux (37.1% vs 2.7%, $p < 0.001$).

En l'absence d'analyse en « single cell » il est difficile de répondre à cette question avec certitude, or la technique que nous avons utilisée a été réalisée sur un culot lymphocytaire sans tri lymphocytaire préalable.

Dans la littérature l'analyse en « single cell » a été réalisée par Kriangkum et al.⁷⁶ Sur 198 patients étudiés 26 possédaient plus d'un réarrangement *IGH*. 19 étaient bialléliques et ils

étaient tous composés d'un réarrangement productif et d'un réarrangement non productif. 7 étaient biclonaux. Ils n'ont ainsi mis en évidence aucun patient ne suivant pas la règle de l'exclusion allélique.

Seule la présence d'au moins trois réarrangements différents peut permettre d'affirmer la présence de deux clones distincts avec certitude. Cela concerne 4 patients dans notre étude. La présence de trois chromosomes 14 (où est localisé le gène des chaînes lourdes des immunoglobulines) doit également être envisagée. Pour les deux patients pour lesquels un caryotype a été réalisé, aucune trisomie 14 n'a été retrouvée.

La comparaison des pourcentages en NGS et en CMF s'est avérée plus difficile que prévue. En fonction des tailles des réarrangements des effets de compétition peuvent biaiser les pourcentages observés et on ne peut pas exclure qu'il s'agisse des deux allèles du même clone. Cependant, de l'expérience du laboratoire, la présence de deux réarrangements sur les deux allèles d'un même clone retrouve rarement des pourcentages si différents.

Dans notre étude, 18 patients étaient déjà suivis pour un SLPC. Il n'a pas été retrouvé d'allusion à la présence de deux clones dans les dossiers. Cela pourrait être un argument en faveur d'une évolution de la pathologie avec apparition d'un deuxième clone. Cependant devant le faible pourcentage des clones dans certains cas et la difficulté de mettre en évidence les deux clones lorsque ceux-ci diffèrent par un faible nombre de marqueurs, il n'est pas exclu que le caractère biclonal ait pu passer inaperçu jusque-là.

Il semble que lorsque deux clones ont clairement été identifiés, le choix de la chimiothérapie a été guidé par les recommandations de prise en charge des lymphomes classiques et le clone le plus agressif constituait la cible du traitement quelle que soit la proportion de celui-ci vis-à-vis de l'autre clone. Dans certains cas ce traitement pouvait également être utilisé pour traiter le deuxième mais la chimiothérapie ne figurait pas toujours dans les recommandations de traitement du deuxième clone.

Il est intéressant de noter que parmi les clones identifiés 31 pouvaient être définis comme des lymphocytoses B monoclonales (MBL). Cette entité qui est apparue dans la classification OMS de 2016 est définie comme la présence d'une population B monoclonale dans le sang périphérique à un taux inférieur à 5 G/l et présentant un phénotype de LLC, de LLC atypique ou de non LLC en l'absence de signe de maladie lymphomateuse. Elle est retrouvée à l'immunophénotypage chez 3,5% des patients ayant un taux de lymphocytes normaux.⁷⁷ Tous les cas de LLC sont précédés d'un stade MBL.⁷⁸ Une MBL avec des signes d'atteinte ganglionnaire peut correspondre à la dénomination de certaines formes de LLC en

« lymphome lymphocytaire ». Dans notre étude 45% des patients ne présentaient pas d'adénopathie ou de splénomégalie, le terme MBL était donc justifié. Dans 5% des cas la présence de ces signes était associée à celle de deux MBL, l'une des deux aurait donc pu être qualifiée de lymphome lymphocytaire. Pour les 50% des cas restants la présence d'adénopathie ou de splénomégalie ne pouvaient pas être imputable au clone MBL ou à un autre clone lymphomateux, la dénomination exacte était alors impossible à définir.

Les MBL de faible nombre (< 0.5 G/l) doivent être distinguées des MBL de nombre élevé. Les MBL de faible nombre ont peu de risque de se développer en LLC et ne requièrent pas de suivi. A l'inverse les MBL de nombre élevé présentent des similarités avec les LLC de stade O dans la classification de RAI du point de vue phénotypique et génétique et nécessitent une surveillance annuelle. Les MBL de type non LLC ont été, pour certains, décrits comme étant proche des LZM.

Le risque annuel des MBL de type LLC de nombre élevé de développer une LLC nécessitant une chimiothérapie est de 1 à 2%, ce taux est similaire au risque de développer un myélome multiple chez les patients avec une gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS).

CONCLUSION

L'incidence des SLPC avec plus d'un clone de 3.4% des SLPC calculée dans notre étude correspond aux données de la littérature.

Pour les patients présentant au moins un clone de LLC les quelques différences qui étaient observées dans la littérature ne semblent pas se retrouver dans notre étude : résultats biologiques classiques, analyse cytogénétique, mutations du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines, caractéristiques cliniques. Aucune modification de la prise en charge par rapport aux patients monoclonaux ne semble être justifiée à l'heure actuelle. Et d'une manière générale pour tous les types de lymphomes.

L'analyse en NGS a été réalisée sur 24 patients. Il n'a pas été retrouvé de réarrangement clonal pour 3 patients, remettant ainsi en question les résultats de l'immunophénotypage.

L'analyse des réarrangements et des profils immunophénotypiques nous a permis de suspecter une évolution clonale dans 5 cas et la présence de deux clones distincts dans 12 cas, dont 4 cas ont été confirmés. Pour les 4 derniers patients l'origine reste incertaine.

La confirmation de la coexistence de 2 clones est facilitée par l'apport du NGS mais reste encore incertaine dans quelques cas. Il faudra tenir compte des résultats des 2 techniques pour conclure entre une évolution clonale et un lymphome composite notamment pour les cas où peu de marqueurs diffèrent en CMF.

Le clone le plus agressif semble guider le choix du traitement. Les comptes rendus de cytométrie en flux devraient ainsi mettre en avant ce clone quel que soit son pourcentage et non le clone prédominant comme c'est le cas à l'heure actuelle.

Nous n'avons pas le même recul pour tous les patients, trois ans et demi pour les premiers, presque nul pour les derniers patients inclus. Il serait intéressant de continuer nos observations et de calculer le pourcentage de recours au traitement à 18 mois pour tous les patients. Nous pourrions également suivre si un ou plusieurs clones sont retrouvés en cas de rechute.

Il serait également intéressant de continuer à inclure des patients pour augmenter le nombre de patients présentant au moins un clone de LLC mais surtout d'autres types de lymphomes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Charles A. Janeway et al., *Immunobiologie* (De Boeck Supérieur, 2009).
- 2 César Cobaleda et al., "Pax5: The Guardian of B Cell Identity and Function," *Nature Immunology* 8, no. 5 (May 2007): 463–470.
- 3 J. Familiades et al., "PAX5 Mutations Occur Frequently in Adult B-Cell Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia and PAX5 Haploinsufficiency Is Associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 Fusion Genes: A GRAALL Study," *Leukemia* 23, no. 11 (2009): 1989–1998.
- 4 Anne Plonquet, "Différenciation Lymphocytaire B Normale," *Revue Francophone Des Laboratoires* 2013, no. 452 (2013): 27–35.
- 5 Ivan M. Roitt, Jonathan Brostoff, and David Male, *Immunologie. 3ème édition* (De Boeck Supérieur, 2002).
- 6 Judy Owen, Jenni Punt, and Sharon Stranford, *Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision* (Dunod, 2014).
- 7 "IMMUNOGLOBULINES - STRUCTURE ET FONCTION," accessed May 30, 2016, <http://www.microbiologybook.org/French-immuno/immchapter4.htm>.
- 8 "GENETIQUE DES IMMUNOGLOBULINES," accessed May 31, 2016, <http://www.microbiologybook.org/French-immuno/immchapter6.htm>.
- 9 Yves Levy, "Mécanisme D'hypermutation Somatique Des Gènes Des Immunoglobulines," *Hématologie* 5, no. 6 (2000): 469–479.
- 10 Janet Stavnezer, "Immunoglobulin Class Switching," *Current Opinion in Immunology* 8 (1996): 199–205.
- 11 Hamblin et al., "Unmutated Ig VH Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia," *Blood* 6 (September 15, 1999): 1848–1854.
- 12 Jean Feuillard and Martine Raphael, "Différenciation Lymphocytaire B et Lymphomes B Périphériques," *Hématologie* 6, no. 5 (December 21, 2000): 345–359.
- 13 Ralf Küppers, "Mechanisms of B-cell Lymphoma Pathogenesis," *Nature Reviews Cancer* 5, no. 4 (April 2005): 251–262.
- 14 Swerdlow et al., "THE UPDATED WHO CLASSIFICATION OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES: The 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid Neoplasms," *Blood* 127, no. 20 (May 19, 2016): 2375–2390.
- 15 Alain Monnereau et al., "Estimation Nationale de L'incidence," 2013, <http://www.e-cancer.fr/content/download/95869/1020796/file/Estimation-nationale-incidence-mortalite-par-cancer-France-1980-2012-Partie-2-Synthese.pdf>.
- 16 Christian Grisselbrecht, *Les Lymphomes Non Hodgkiniens* (John Libbey Eurotext, 2008).
- 17 Félix Reyes, *Les lymphomes malins non hodgkiniens* (John Libbey Eurotext, 2000).
- 18 F. Drouet et al., "Lymphomes Malins Non Hodgkiniens," *Cancer/Radiothérapie* 14 (2010): 210–229.
- 19 "BFA - Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative - CNRS UMR 8251 - Principe de La Cytométrie En Flux et Du Tri Cellulaire," accessed June 6, 2016, <http://www.bfa.univ-paris-diderot.fr/spip.php?rubrique99>.
- 20 IUIS-WHO Nomenclature Subcommittee, "Nomenclature for Clusters of Differentiation (CD) of Antigens Defined on Human Leukocyte Populations," *Bulletin of the World Health Organization* 62, no. 5 (1984): 809.
- 21 Christine Amoulet et al., "Four- and Five-color Flow Cytometry Analysis of Leukocyte Differentiation Pathways in Normal Bone Marrow: A Reference Document Based on a Systematic Approach by the GTLLF and GEIL," *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 9999B (2009).

-
- 22 M. C. Bene et al., "Immunophenotyping of Acute Leukemia and Lymphoproliferative Disorders: a Consensus Proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10," *Leukemia* 25, no. 4 (2011): 567–574.
- 23 Magali Le Garff-Tavernier, Myrto Costopoulos, and Hélène Merle-B eral, "Place de La Cytométrie En Flux Dans Le Diagnostic et Le Suivi Des Syndromes Lymphoprolifératifs B," *Revue Francophone Des Laboratoires* 2013, no. 452 (2013): 37–48.
- 24 F. E. Craig and K. A. Foon, "Flow Cytometric Immunophenotyping for Hematologic Neoplasms," *Blood* 111, no. 8 (January 11, 2008): 3941–3967.
- 25 Matutes et al., "The Immunological Profile of B-cell Disorders and Proposal of a Scoring System for the Diagnosis of CLL," *Leukemia* 8, no. 10 (October 1994): 1640–1645.
- 26 Moreau et al., "Improvement of the Chronic Lymphocytic Leukemia Scoring System With the Monoclonal Antibody SN8(CD79b)," *American Journal of Clinical Pathology* 108, no. 4 : 378–382.
- 27 M. Dungarwalla, E. Matutes, and C. E. Dearden, "Prolymphocytic Leukaemia of B- and T-cell Subtype: a State-of-the-art Paper: B- and T-prolymphocytic Leukaemia," *European Journal of Haematology* 80, no. 6 (June 2008): 469–476.
- 28 Juehua Gao et al., "Immunophenotypic Variations in Mantle Cell Lymphoma," *American Journal of Clinical Pathology* 132, no. 5 (November 2009): 699–706.
- 29 Giuseppe A. Palumbo et al., "CD200 Expression May Help in Differential Diagnosis Between Mantle Cell Lymphoma and B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia," *Leukemia Research* 33, no. 9 (September 2009): 1212–1216.
- 30 Horatiu Olteanu et al., "CD23 Expression in Follicular Lymphoma: Clinicopathologic Correlations," *American Journal of Clinical Pathology* 135, no. 1 (January 2011): 46–53.
- 31 Francine Garnache Ottou et al., "Peripheral Blood 8 Colour Flow Cytometry Monitoring of Hairy Cell Leukaemia Allows Detection of High-Risk Patients," *British Journal of Haematology* 166, no. 1 (July 2014): 50–59.
- 32 L. Baseggio et al., "Relevance of a Scoring System Including CD11c Expression in the Identification of Splenic Diffuse Red Pulp Small B-cell Lymphoma (SRPL)," *Hematological Oncology* 29, no. 1 (March 2011): 47–51.
- 33 Christine B. Kost, Jeannine T. Holden, and Karen P. Mann, "Marginal Zone B-cell Lymphoma: A Retrospective Immunophenotypic Analysis," *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 74B, no. 5 (September 2008): 282–286.
- 34 Sergej Konoplev et al., "Immunophenotypic Profile of Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldenström Macroglobulinemia," *American Journal of Clinical Pathology* 124, no. 3 (September 2005): 414–420.
- 35 Virginie Eclachea and Fanny Baran-Marszaka, "Intérêt de La Cytogénétique et de La Biologie Moléculaire Pour Le Diagnostic Des SLP B Eclache.pdf," *Revue Francophone Des Laboratoires* 452 (05/20103): 49–59.
- 36 D Leroux, C Lefebvre, and M Callanan, "Anomalies génétiques des leucémies lymphoides chroniques," *Pathologie Biologie* 51, no. 6 (August 2003): 366–374.
- 37 K. R. Rai et al., "Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia," *Blood* 46, no. 2 (August 1, 1975): 219–234.
- 38 J. L. Binet et al., "A New Prognostic Classification of Chronic Lymphocytic Leukemia Derived from a Multivariate Survival Analysis," *Cancer* 48, no. 1 (July 1, 1981): 198–206.
- 39 HAS, "GUIDE - AFFECTION DE LONGUE DURÉE Lymphomes Non Hodgkiniens de L'adulte," March 2012.
- 40 András Matolcsy, "High-Grade Transformation of Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphomas: Mechanisms of Tumor Progression," *Leukemia & Lymphoma* 34, no. 3–4 (January 1, 1999): 251–259.
- 41 S. J. Horning and S. A. Rosenberg, "The Natural History of Initially Untreated Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphomas," *The New England Journal of Medicine* 311, no. 23 (December 6, 1984): 1471–1475.
- 42 Eric D. Hsi, Gerald Hoel, and Raymond R. Tubbs, "Biclonal Chronic Lymphocytic Leukemia" *Hematopathology* 113 (2000): 798–804.
- 43 Nafila Al-Riyami et al., "Biclonal Gammopathy in Chronic Lymphocytic Leukemia: Case Report and Review of the Literature," *Oman Medical Journal* 30, no. 3 (May 15, 2015): 216–218.

-
- 44 J.P. Delville et al., "Biclonal Low Grade B-cell Lymphoma Confirmed by Both Flow Cytometry and Karyotypic Analysis, in Spite of a Normal Kappa/lambda Ig Light Chain Ratio," *American Journal of Hematology* 82, no. 6 (June 2007): 473–480.
- 45 J. Gonzalez-Campos et al., "Chronic Lymphocytic Leukemia with Two Cellular Populations: a Biphenotypic or Biclonal Disease," *Annals of Hematology* 74, no. 5 (1997): 243–246.
- 46 Zahid Kaleem et al., "Composite B-Cell and T-Cell Non-Hodgkin Lymphoma of the Tibia," *American Journal of Clinical Pathology* 123, no. 2 (February 2005): 215–221.
- 47 Leonardo Boiocchi et al., "Composite Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma and Follicular Lymphoma Are Biclonal Lymphomas: A Report of Two Cases," *American Journal of Clinical Pathology* 137, no. 4 (April 2012): 647–659.
- 48 Andrei TURBATU et al., "Composite Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Follicular B-Cell Lymphoma—Case Report and Review of Literature," *Maedica* 9, no. 2 (2014): 204.
- 49 Endi Wang et al., "Composite Lymphoid Neoplasm of B-cell and T-cell Origins: a Pathologic Study of 14 Cases," *Human Pathology* 45, no. 4 (April 2014): 768–784.
- 50 Céline Acker et al., "Leucemie lymphoïde chronique biclonale ou biphenotypique une reponse par le traitement.pdf," *Ann Biol Clin* 69 (2011): 325–330.
- 51 Florian Rabiller et al., "Lymphome composite : association d'un lymphome folliculaire et d'une leucémie lymphoïde chronique," *Annales de Pathologie* 28, no. 1 (February 2008): 41–44.
- 52 M.-L. Sanchez, "Incidence and Clinicobiologic Characteristics of Leukemic B-cell Chronic Lymphoproliferative Disorders with More Than One B-cell Clone," *Blood* 102, no. 8 (October 15, 2003): 2994–3002.
- 53 Custer, "Pitfalls in the Diagnosis of Lymphoma and Leukemia from the Pathologist's Point of View.," *Proceedings of the Second National Cancer Conference.*, 1954, 554–557.
- 54 Henry Rapaport, "Follicular Lymphoma: A Re-evaluation of Its Position in the Scheme of Malignant Lymphoma, Based on a Survey of 253 Cases.," *Cancer* 9 (August 1956): 792–820.
- 55 Hun Kim, Michael R Hendrickson, and Ronald F Dorfman, "Composite Lymphoma," *Cancer* 40 (September 1977): 959–976.
- 56 NADIA M. Mokhtar, "Composite Lymphoma," *J Egyptian Nat Cancer Inst* 19 (2007): 171–175.
- 57 A. Furlan et al., "Sequential Development of Large B Cell Lymphoma in a Patient with Peripheral T-cell Lymphoma," *Haematologica* 93, no. 1 (January 1, 2008).
- 58 András Matolcsy et al., "Clonal Evolution of B Cells in Transformation from Low- to High-Grade Lymphoma," *European Journal of Immunology* 29, no. 4 (April 1999): 1253–1264.
- 59 M. Hallek et al., "Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: A Report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia Updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 Guidelines," *Blood* 111, no. 12 (June 15, 2008): 5446–5456.
- 60 Hartmut Döhner et al., "Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia," *New England Journal of Medicine* 343, no. 26 (2000): 1910–1916.
- 61 Wolfgang Kern et al., "Flow Cytometric Identification of 76 Patients with Biclonal Disease Among 5523 Patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia (B-CLL) and Its Genetic Characterization" *British Journal of Haematology* 164, no. 4 (February 2014): 565–569.
- 62 Sanchez, "Incidence and Clinicobiologic Characteristics of Leukemic B-cell Chronic Lymphoproliferative Disorders with More Than One B-cell Clone." *Blood* 102, no. 8 (October 15, 2003): 2994-3002.
- 63 Gregory Lazarian, "Association Of More Than One B Cell Clone Arises In Any Type Of Leukemic Chronic B Cell Disorder" *Blood* 122 (November 15, 2015): 4161–4161.
- 64 Sanja Perković et al., "Multiparameter Flow Cytometry Is Necessary for Detection, Characterization and Diagnostics of Composite Mature B-cell Lymphoproliferative Neoplasms," *International Journal of Hematology* 98, no. 5 (November 2013): 589–596.
- 65 Edward E. Morse et al., "The Role of Flow Cytometry in the Diagnosis of Lymphoma: A Critical Analysis," *Annals of Clinical & Laboratory Science* 24, no. 1 (1994): 6–11.

-
- 66 Lili Wang et al., "SF3B1 and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia," *New England Journal of Medicine* 365, no. 26 (2011): 2497–2506.
- 67 B. Austen, "Mutations in the *ATM* Gene Lead to Impaired Overall and Treatment-Free Survival That Is Independent of *IGVH* Mutation Status in Patients with B-CLL," *Blood* 106, no. 9 (November 1, 2005): 3175–3182.
- 68 Terry J. Hamblin et al., "Unmutated *Ig VH* Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia," *Blood* 94, no. 6 (September 15, 1999): 1848.
- 69 Ralf Küppers, Ulrich Dührsen, and Martin-Leo Hansmann, "Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Composite Lymphomas," *The Lancet Oncology* 15, no. 10 (2014): 435–446.
- 70 J J M van Dongen et al., "Design and Standardization of PCR Primers and Protocols for Detection of Clonal Immunoglobulin and T-Cell Receptor Gene Recombinations in Suspect Lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936," *Leukemia* 17, no. 12 (December 2003): 2257–2317.
- 71 Koichi Miyamura et al., "Single Clonal Origin of Neoplastic B-Cells with Different Immunoglobulin Light Chains in a Patient with Richter's Syndrome," *Cancer* 66, no. 1 (July 1, 1990): 140–144.
- 72 A. W. Langerak et al., "Immunoglobulin Sequence Analysis and Prognostication in CLL: Guidelines from the ERIC Review Board for Reliable Interpretation of Problematic Cases," *Leukemia* 25, no. 6 (2011): 979–984.
- 73 Laura Z. Rassenti and Thomas J. Kipps, "Lack of Allelic Exclusion in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia," *The Journal of Experimental Medicine* 185, no. 8 (1997): 1435–1446.
- 74 Stamatopoulos K et al., "Evidence for Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Gene Replacement in a Patient with B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia," *Leukemia* 10, no. 9 (1996): 1551–1556.
- 75 Karla Plevova et al., "Multiple Productive Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangements in Chronic Lymphocytic Leukemia Are Mostly Derived from Independent Clones," *Haematologica* 99, no. 2 (February 4, 2014): 329.
- 76 Jitra Kriangkum et al., "Single-Cell Analysis and Next-Generation Immuno-Sequencing Show That Multiple Clones Persist in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia," ed. Derya Unutmaz, *PLOS ONE* 10, no. 9 (September 9, 2015).
- 77 Andy C. Rawstron et al., "Monoclonal B Lymphocytes with the Characteristics of 'indolent' Chronic Lymphocytic Leukemia Are Present in 3.5% of Adults with Normal Blood Counts," *Blood* 100, no. 2 (2002): 635–639.
- 78 Ola Landgren et al., "B-cell Clones as Early Markers for Chronic Lymphocytic Leukemia," *New England Journal of Medicine* 360, no. 7 (2009): 659–667.

ANNEXES

Annexe 1 : Préparation des échantillons pour la cytométrie en flux

Marquage des sous populations lymphocytaires :

- incubation de 50µl de sang total ou de moelle osseuse anticoagulés par EDTA (tubes de 2, 4.5 ou 7 ml) ou de 100 µl pour les liquides pleuraux, pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière dans un tube à hémolyse avec le panel d'anticorps monoclonaux;
- lyse des globules rouges avec 500µl de BD FACSLysis (BD biosciences) pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière ;
- acquisition sur le cytomètre.

Marquage des lymphocytes B :

- incubation de 100µl de moelle osseuse totale ou de sang total anticoagulé par EDTA (tubes de 2, 4.5 ou 7 ml) ou 200µl de liquide pleural pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière dans un tube à hémolyse avec le panel d'anticorps monoclonaux ;
- lyse des globules rouges avec 2ml de BD FACSLysis à 10% (BD biosciences) pendant 15 minutes ;
- lavage des cellules avec 2 ml de CellWash (BD biosciences) et reprise dans 250µl de cette même solution ;
- acquisition sur le cytomètre.

	FITC	PE	PECF594	PerCP 5.5	PC7	APC	AA700	APCG7	BV421	BV510
TBNK		CD16	CD56		CD4	CD8	CD3	CD45		CD19
		10 µl	5 µl		2 µl	2 µl	5 µl	1.5 µl		1.5 µl
Matutes	FMC7	LAMBDA		CD79B	CD5	KAPPA		CD45	CD23	CD19
	3 µl	6 µl		3 µl	1.5 µl	6 µl		1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
Lymphome	ROR	CD43		CD180	CD200	CD22	CD20	CD45	CD10	CD19
	5 µl	3 µl		10 µl	5 µl	2 µl	2 µl	1.5 µl	2 µl	1.5 µl
Tricho.	CD103			CD123		CD11C		CD45	CD25	CD19
	3 µl	3 µl		3 µl		3 µl		1.5 µl	5 µl	1.5 µl

Annexe 2 : Préparation des échantillons pour l'analyse cytogénétique

- centrifugation des tubes de sang, de moelle osseuse ou de liquide pleural (sauf si le liquide est pauvre) anticoagulés par héparine à 2000 rpm pendant 10 minutes ;
- transfert des buffy coat (couche de leucocytes concentrés par la centrifugation à l'interface entre le plasma et les hématies) ou des culots cellulaires pour les liquides pleuraux dans des tubes stériles additionnés de 2 ml de milieu de culture complet à 37°C (RPMI1640 without glutamine, 20% sérum de veau foetal, 2 mM L-glutamine, pénicilline-streptomycine (120 UI/ml – 120 µg/ml)) ;
- numération cellulaire à l'aide d'un automate de numération ;
- mise en culture de 10 millions de cellules dans un volume final de 5 ml (SLP à grandes cellules B) ou 10 ml (SLP à petites cellules B) de milieu de culture complet dans des flasques de 25 ml (pour les LLC avec une numération absolue supérieure à 80 millions la concentration d'ensemencement est doublée) ;
- pour les SLP à petites cellules B, ajout d'un aliquot de Premix AmpliB (mix contenant du DSP30 et de l'IL2, Amplitech) à 9 ml de suspension cellulaire avant de mettre en culture 72h ;
- pour les SLP à grandes cellules B, mise en culture pendant 24h sans mitogène ;
- arrêt de la culture par l'ajout de 30 µl de Colcémid (10 µg/ml) dans les flasques de 5 mL et 50 µl dans les flasques de 10 ml pendant 30 minutes ;
- le passage des tubes sur l'automate Excilone permet la réalisation d'un choc hypotonique et la fixation des suspensions cellulaires :
 - o centrifugation ;
 - o rejet du surnageant ;
 - o ajout d'une solution hypotonique et incubation 20 min à 37°C ;
 - o fixation (1 volume d'acide acétique glacial + 3 vol de méthanol à 100%) et centrifugation ;
 - o répétition de l'étape précédente plusieurs fois.

Les suspensions cellulaires ensuite été étalées sur des lames, dénaturées et colorées pour obtenir des bandes RHG :

- aspiration et élimination des surnageants et remise en suspension des culots à l'aide d'une pipette pasteur en verre à pointe fine ;
- dépôt d'une goutte de chaque suspension au milieu de plusieurs lames à l'intérieur d'un Thermotron (enceinte régulée) ;

- immersion des lames pendant 5 minutes dans du méthanol pur puis rinçage dans deux bains d'eau distillée ;
- immersion dans une solution de phosphate préalablement chauffée à 88°C, pendant un temps déterminé localement chaque jour, puis trempage dans deux bains successifs d'eau fraîche ;
- coloration des lames avec du Giemsa à 4% pendant 2mn 30 à 3 minutes puis rinçage sous l'eau du robinet.

Après l'étalement, la recherche des mitoses est faite sur un microscope automatique (le Métafer), programmé pour distinguer les mitoses au grossissement x63. Après tri des images le caryotype est réalisé informatiquement sur vingt mitoses.

Annexe 3 : Préparation des échantillons pour l'hybridation in situ en fluorescence (FISH)

En raison de la présence de fluorochromes, la manipulation s'effectue à l'abri de la lumière.

Préparation des lames :

- la préparation et l'étalement des lames est identique à l'analyse caryotypique ;
- trempage des lames successivement dans 4 bain d'éthanol à 70%, 80%, 90% et 100% pendant 3 minutes chacun à température ambiante ;
- séchage à température ambiante ;

Dénaturation des lames :

- dépôt de 125 µl de Formamide 70%/2xSSC pH7 sur les lames et ajout d'une lamelle ;
- chauffage 3 minutes sur une plaque de dénaturation à 70°C ;
- trempage des lames dans un bain de 2xSSC à 4°C après avoir enlevé la lamelle ;
- déshydratation des lames dans 5 bains successifs d'éthanol à 70%, 80%, 90%, 100% et 100% pendant 3 minutes à 4°C.
- séchage à température ambiante ;

Dénaturation de la sonde :

- préparation des sondes dans des microtubes de 0.5 ml ;
- dénaturation dans le thermocycleur ;

Hybridation :

- dépôt de 5 µl de sonde sur chaque lame et ajout d'une lamelle ;
- incubation des lames toute une nuit à 37°C dans une chambre humide ;

Lavage post-hybridation :

- 0.4 SSC/0.3 NP40, 3 minutes à 68°C ;
- 2 SSC/0.1 NP40, 30 secondes à température ambiante ;

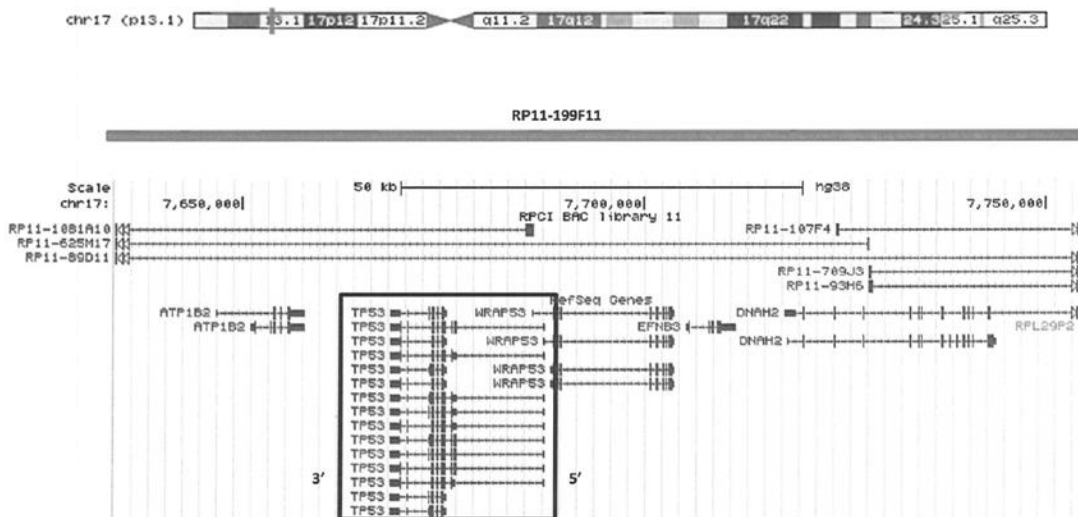
Contre coloration :

- dépôt d'une goutte de DAPI sur chaque lame et ajout d'une lamelle.

Annexe 4 : Sondes utilisées pour l'hybridation in situ en fluorescence (FISH)

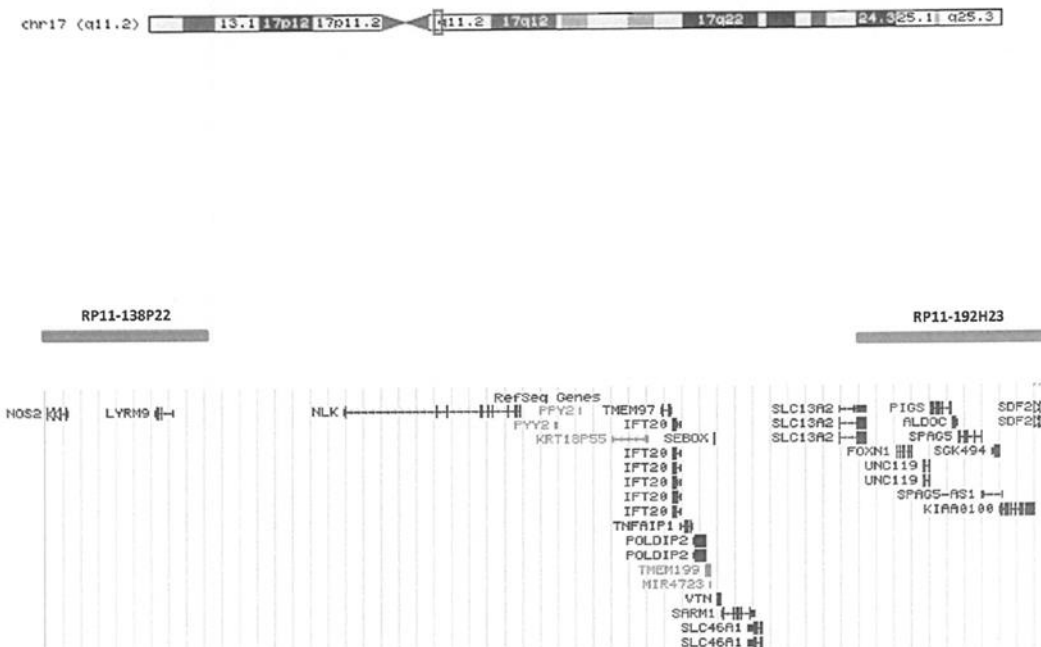
TP53 : 17p13

chr17:7,634,093-7,755,109 (GRCh38/hg38)



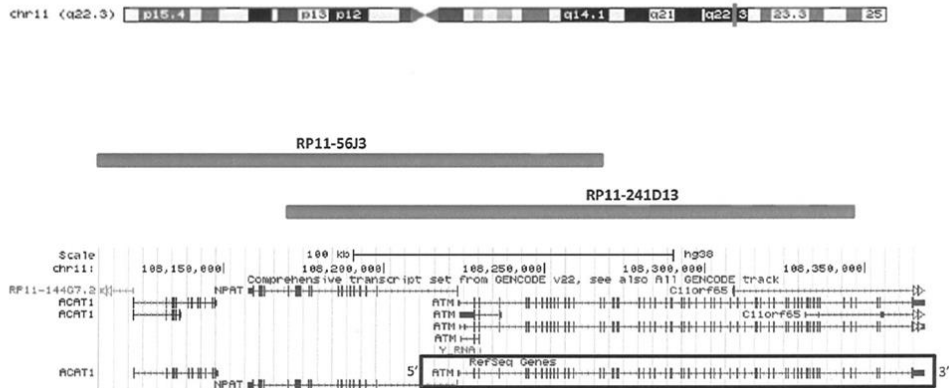
17q11

chr17:27,782,612-28,657,811 (GRCh38/hg38)



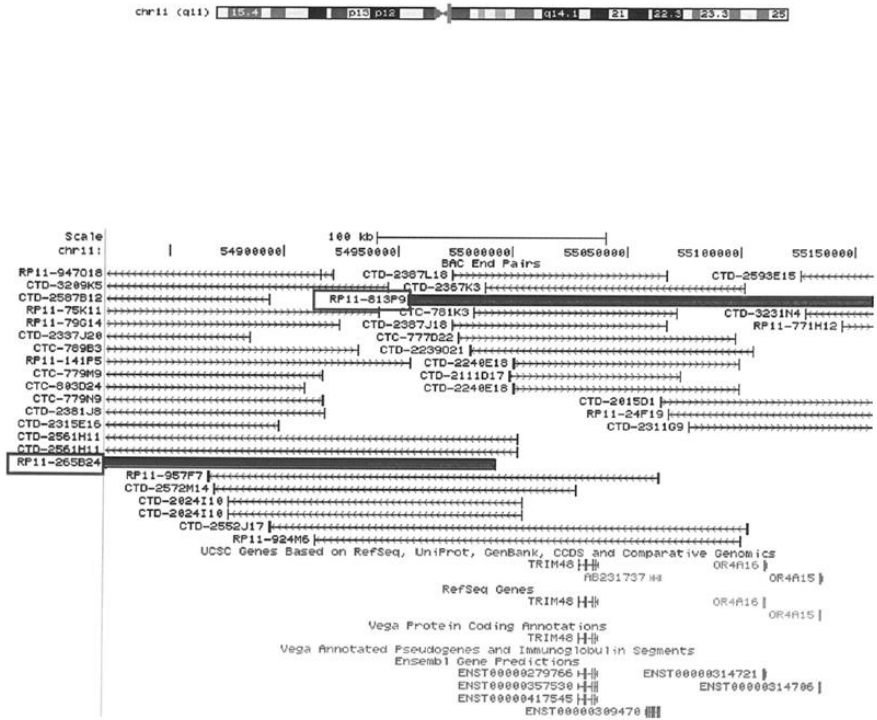
ATM: 11p22

chr11:108,111,090-108,346,123 (GRCh38/hg38)



11q11

chr11:55,054,975-55,390,623 (GRCh38)



Annexe 5 : Protocole d'extraction de l'ADN

- ajout de 600 μ l de Nuclei Lysis Solution dans le tube contenant le culot préalablement décongelé ;
- ajout de 3 μ l de RNase Solution ;
- incubation 30 minutes à 37°C au bain marie ;
- ajout de 200 μ l de Protein Precipitation Solution et conservation dans la glace pendant 5 minutes ;
- centrifugation 4 minutes à 16000g ;
- transfert du surnageant dans un tube contenant 600 μ l d'isopropanol ;
- centrifugation 1 minutes à 16000 g ;
- élimination du surnageant et ajout de 600 μ l d'éthanol à 75% ;
- centrifugation 1 minute à 16000 g et élimination du surnageant ;
- reprise de l'ADN dans 100 μ l de DNA Rehydratation Solution.

Annexe 6 : Protocole PCR1 multiplex FR2

Préparation du mix :

Réactifs	Concentration (μM)	Volume (μl)
H2O		3.5
TAQ GOLD 360		10
ql_VH1-FR2	10	0.25
ql_VH2-FR2		
ql_VH3-FR2		
ql_VH4-FR2		
ql_VH5-FR2		
ql_VH6-FR2		
ql_VH7-FR2		
ql_JH1245		
ql_JH3		
ql_JH6		

4 μl d'ADN à 150 ng/ μl sont ajoutés au mix et la PCR1 est lancée en plaque :

- 1 cycle, 3 minutes à 98°C ;
- 30 cycles, 10 secondes à 98°C, 30 secondes à 60°C, 1 minute à 72°C ;
- 1 cycle, 5 minutes à 72°C puis pause à 4°C.

Annexe 7 : Protocole post-PCR1

- centrifugation des plaques ;
- purification sur billes (Agencourt Ampure XP Beads, beckman Coulter) à l'aide du robot :
 - o transfert des billes dans la plaque de purification (16µl) ;
 - o transfert des produits de PCR dans la plaque de purification (20µl) ;
 - o incubation 5 minutes ;
 - o transfert sur l'aimant et incubation 4 minutes ;
 - o retrait du surnageant ;
 - o deux lavages en éthanol 80% (VWR) ;
 - o séchage 5 minutes ;
 - o ajout du tampon d'éluion Buffer EB (Quiagen) 10 mM Tris-HCl pH 8.5 (33µl) ;
 - o mélange à la pipette
 - o transfert sur l'aimant et incubation 4 minutes ;
 - o transfert des éluats dans une nouvelle plaque.

- centrifugation de la plaque ;

- préparation du mix :

Réactifs	Volume (µl)
Buffer HF 5X	3
DNTP 10 mM (Cliniscience)	0.3
H2O	4.1
Phusion 5U/µl	0.1

- ajout de 2.5 µl d'ADN au mix et aux index ;
- centrifugation de la plaque ;
- lancement de la PCR2 :
 - o 98°C, 3 minutes ;
 - o 98°C, 10 secondes ;
 - o 55°C, 30 secondes ;
 - o 72°C, 30 secondes ;
 - o 72°C, 5 minutes ;
 - o 4°C, pause.
- centrifugation de la plaque ;
- deuxième purification sur billes à l'aide du robot (volume de billes : 16 µl, volume de PCR : 15 µl, volume d'éluion : 30 µl) ;
- centrifugation de la plaque ;
- dosage fluorimétrique :
 - o préparation d'une gamme d'ADN contrôle (λ DNA standard);
 - o distribution de 45 µl de TE 1X dans tous les puits d'une plaque ;
 - o ajout à chaque puits de 5 µl de produits de purification issus de la PCR2 ou de 50 µl de la gamme ;
 - o distribution de 50 µl de solution de Picogreen dans chaque puit ;
 - o centrifugation de la plaque ;
 - o lecture sur Fluoroskan.

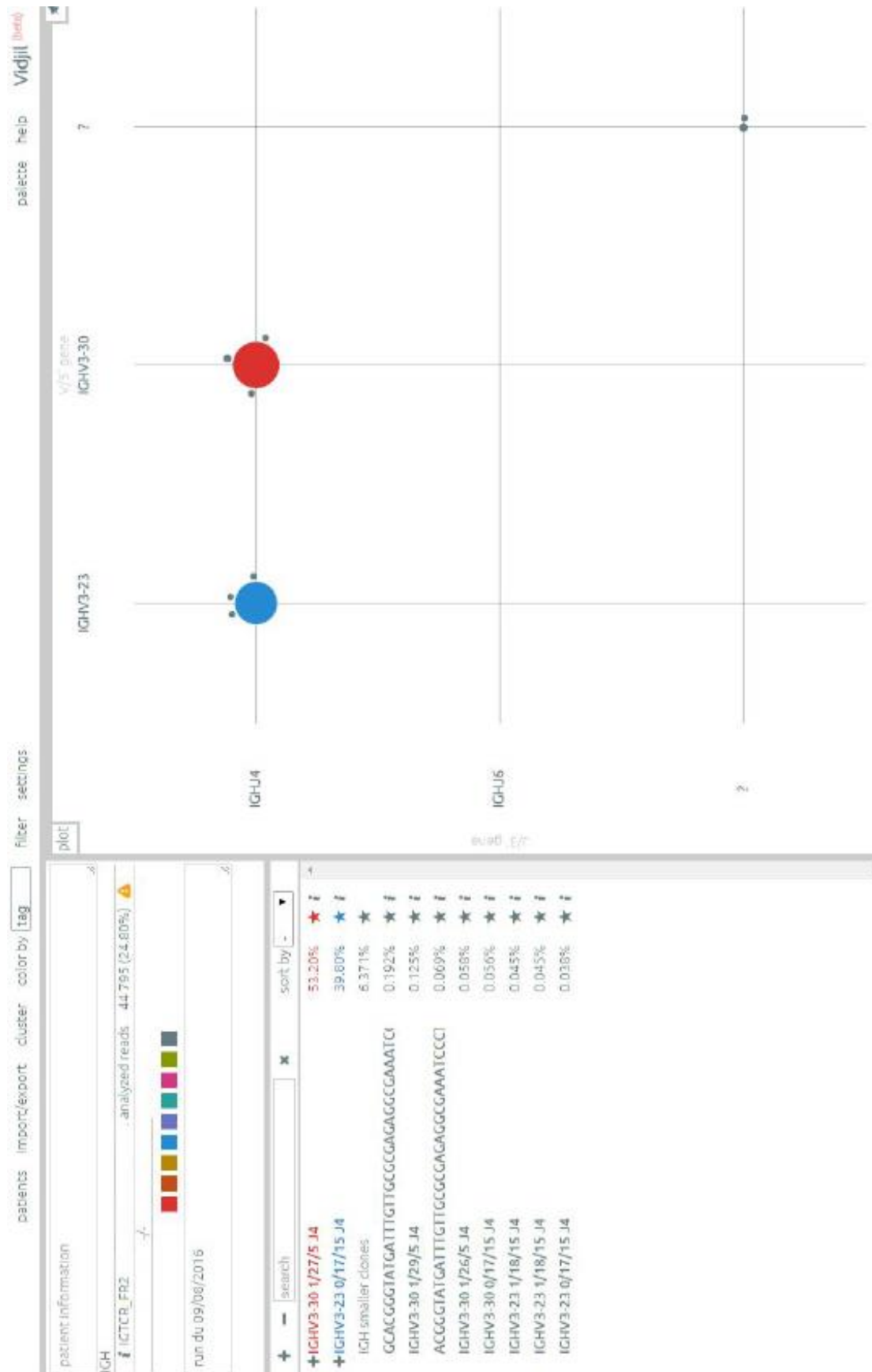
Annexe 8 : Quantification de la librairie

- dilution de la librairie au 1/1000^{ème} ;
- préparation du mix :
 - Master Mix + primer premix : 6 µl ;
 - H2O : 3 µl.
- ajout de 9 µl de mix par puit et 1 µl de points de gamme (Std 1, 2 et 3) ou de dilution de la librairie ;
- quantification sur un Light cycler :
 - 95°C, 5 minutes ;
 - 25 cycles de 15 secondes à 95°C et 20 secondes à 60°C.

Annexe 9 : Amorces utilisées pour le NGS

ql_VH1-FR2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
ql_VH2-FR2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGATCCGTCAGCCCCAGGGAAGG
ql_VH3-FR2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA
ql_VH4-FR2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGG
ql_VH5-FR2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGG
ql_VH6-FR2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAG
ql_VH7-FR2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAA
ql_JH1245	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACCTGAGGAGACGGTGACCAGGTT
ql_JH3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTACCTGAAGAGACGGTGACCATTGT
ql_JH6	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT

Annexe 10 : Exemple de profil NGS



N°	Age	Sexe	Hb. g/dl	PQ G/l	Ly. G/l	Cel. ly. % (G/l)	LDH UI/l	ASAT UI/l	ALAT UI/l	Electro. des prot.	Immuno fix.	Antécédents SLPC +/- traitement	Hépatomégalie	Spléno mégalie	AdénoPAT.	Stade Binet	Stade Ann Arbor	Prise en charge thérapeutique et évolution
1	86	M										ND	ND	ND	ND			ND
2	75	M	14,5	160	6,4	15 (1,90)	348	26	27	normale	IgM κ	non	non	non	non	A		surveillance
3	59	M	14,9	171	39	0	198	30	23	hypo γ	abs. d'anom.	non	oui	oui	oui	B	ND	6 cycles R-FC
4	81	M	9,1	77	1,65	0	83	30	11	hyper γ, 1 pic γ	IgG κ	non	non	non	non			6 cycles R-CD
5	85	M		57						normale		non	non	non	non	C		surveillance à 3 ans majoration thrombopénie: Rituximab
6	68	F	12,7	189	7,9	0	335	23	14	normale		non	non	non	non			surveillance
7	83	F	13,9	137	41,8	0	196	16	10	hypo γ		LLC (2001)	non	non	oui	A		surveillance
8	95	M	12,9	182	8,6	0	195	25	17	hypo γ		non	non	oui	oui	A		surveillance puis Chloraminophene à 36 mois
9	93	F	6,4	459	2,1	0	336	51	16	hypo γ		LLC en rémission	non	non	non	C		décès
10	56	M	13,5	200	1,3	0	199	60	66	hypo γ	IgG λ	non	non	oui	oui		III	6 cycles R-CHOP + 6 Rituximab 12 mois (rechute): 4 cycles R-DHAOX puis autogreffe conditionnée BendaEAM
11a	88	M	12,7	216	3,6	0	199	22	16	normale	abs. d'anom.	érythrodermie avec prurit	non	non	non			Methotrexate
11b	91	M	13,6	188	5,4	sézary 30%	184	21	12	normale		-	non	non	oui	A		Acitrétine
12	54	F	11,9	221	3,9	non	213	25	38	normale	IgM κ	LLC (infiltration rénale)	non	non	oui		II	6 cycles R-CD
13	69	M	13,4	155	2,8	15 (1)	133	20	7	normale	abs. d'anom.	non	non	oui	oui		III	surveillance
14	51	M	12,8	137	3,4	66 (17,20)	433	76	36	hypo γ		non	non	oui	oui		III	6 cycles R-CHOP + 6 Rituximab 15 mois (rechute): 4 cycles R-DHAOX 20 mois (rechute): Rituximab + Idelalisib 30 mois : autogreffe conditionnée BendaEAM
15	66	M	13,7	222	23,3	0	143	19	33	normale		ND	ND	ND	ND			ND
16	93	M										ND	ND	ND	ND			ND
17	77	M	16,1	344	3,5	0				normale		non	non	oui	oui	A		surveillance
18	58	F	10,4	25	13,8	0	277	31	71	2 pics	IgG λ et IgM λ	LLC (2008) : Chloranbucil/R-FC (2009)/Bendamustine Rituximab (2013)/DHAC (2014)/Idelalisib (2014)	non	oui	oui	C		ibrutinib en ATU
19	68	F	10,7	233	7,4	0				1 pic β		LLC (2009)	non	oui	non	A	I	surveillance
20	91	F	13,4	271	5,7	0	179	18	13	normale		ND	ND	ND	ND			ND
21	68	F	12,9	203	5,6	0	174	10	8	1 pic γ	IgM λ	lymphome lymphoplasmo.	non	non	non		I	surveillance 10 mois (AEG et adénopathies médiastinales (stade IV Ann Arbor)): 6 cycles R-CD
22	85	M	9,1	35	1,5	0	1244	51	17	pic γ	IgG κ	ND	ND	ND	ND			ND
23	71	M	13,3	155	11,8	0	158	18	18	hypo γ		non	non	non	non	A		surveillance 12 mois (majoration neutropénie): 8 cycles R-CHOP
24	84	M	11,1	188	103	0	303	21	18	normale	IgG λ	LLC (1995)	oui	oui	oui	C		R-Bendamustine
25	76	M	14,2	162	6,3	0				2 pics γ	IgG κ et IgM κ	non	non	non	non			surveillance
26	59	M	12,9	79	2,2	tricho. 11 (0,46)				hypo γ		leucémie à tricho. (2005): 2-CDA	non	non	non		I	Cladribine
27	83	M	12,9	172	2,8	0	167	9	13	1 pic	IgG κ	LLC à tropisme rénal	non	non	non		IV	R-Bendamustine

N°	Age	Sexe	Hb. g/dl	PQ G/l	Ly. G/l	Cel. ly. % (G/l)	LDH UI/l	ASAT UI/l	ALAT UI/l	Electro. des prot.	Immuno fix.	Antécédents SLPC +/- traitement	Hépatomegalie	Spléno mégalie	Adénopat.	Stade Binet	Stade Ann Arbor	Prise en charge thérapeutique et évolution
28	85	M	14,5	329	6,6	0	304	25	13	normale		non	non	oui	oui	A		surveillance
29	82	M	12	276	12,3	0		23	25			non	non	non	non	A		surveillance
30	74	M	12,3	179	3,2	0	145	20	47	1 pic γ	IgM	non	non	non	non			surveillance
31	87	M	13,9	246	5,8	0				normale		non	non	non	non			surveillance
32	53	F	9,9	69	7,4	tricho. 9 (0.81)	128	15	20	hyper γ	profil oligoclonal	non	non	non	oui	C	II	4-6 cycles de Pentostatine
33	69	M	13,1	57	50,1	0		79	52	hypo γ		non	oui	oui	oui		III	décès
34	76	O	14,2	166	6,9	0				normale	abs. d'anom.	non	non	non	non	A		surveillance
35	67	M	15,2	107	4,6 (+ omb.)	0				normale	abs. d'anom.	lymphome (2002): ACVBP et 3 Holoxan - VP-16 + Méthotrexate	non	oui	oui		I	surveillance
36	82	M	9,6	256	2,5	0	147	68	66	hyper γ		non	oui	oui	oui			6 cycles R-Bendamustine
37	80	M	11,9	208	0,84	0						ND	ND	ND	ND			ND
38	76	F	10,9	163	1,43	7 (0.2)						non	oui	oui	oui		IV	chimiothérapie (?)
39	69	M	12,4	140			159	15	15	hypo γ		LLC stade A	non	oui	oui	A		R-FC
40	51	M	14,8	180	27,3 (+ omb.)	0	143	12	23			LLC stade A	non	non	non	A		surveillance
41	80	F	11,7	399	6,3	0	176	27	23	normale	abs. d'anom.	non	non	non	non	A		surveillance
42	72	M	10,3	125	0,5	0	266	32	19			lymphome manteau (2001): chimio + autogreffe/R-CHOP et R-FC (2011)/R-bendamustine Ibrutinib (2004)	non	non	oui		IV	décès
43	83	M	13,4	273	4,1	0				2 pics		lymphome primitif du SNC	non	non	non		I	Témzolomide + Rituximab
44	66	M	11,3	180	1,8	0	270	25	25	pic γ	IgM κ	maladie de Waldenström	non	non	oui		III	4 cycles R-CD rechute : R-Bendamustine
45	75	F	9,6	332	1,8	0	120	20	18	hypo γ, 1 pic β		non	non	non	non		I	R-CVP 8 cycles
46	85	M	14,9	119	1,6	0				normale		non	non	oui	non		I	surveillance
47	87	M	15,3	153	11,9 (+ omb.)	0						non	non	non	non	A	I	surveillance
48	84	F	9	124	5,1	0				pic en γ		non	non	oui	oui		III	Chloraminophene + EPO
49	86	M	9	218	0,8	0		43	20	1 pic β et 1 γ	IgM κ	maladie de Waldenström	ND	ND	ND			Chloraminophene + EPO
50a / 50b	76	M	9,8	124	2,4	0	159	23	18	pic γ	IgM λ et κ libre	non	oui	non	non		I	surveillance
51	71	M	11,1	404	1,7	0		13	31	hypo γ, 1 pic β	IgM λ et κ libre	non	non	spléno nect.	non		I	Prednisone
52	70	M	14,5	259	2,1	fol. 7 (0.6)		31	36	hypo γ		leucémie à LGL	non	oui	oui		III	R-CHOP + entretien Rituximab
53	89	F										ND	ND	ND	ND			ND
54	83	M	13,3	118	0,2 (10.9)	62	274	15	18	pic γ	IgM κ	non	oui	oui	ND			R-Chloraminophene
55	87	M	8,3	114	1,6	0	156	23	7	normale		maladie de Waldenström (1998)	non	non	oui		I	surveillance
56	73	M	12,8	569	5,1	0		29	50	normale	abs. d'anom.	non	non	non	non	A	I	surveillance

non : absence ; oui : présence ; ND : non disponible ; adénopath. : adénopathies ; Hb. : hémoglobine ; PQ : plaquettes ; Ly : lymphocytes ; Cellules ly. : cellules lymphomateuses ; omb. : ombres cel

Annexe 12 : Caryotype

N°	Formule caryotype	Conclusion
3	46,XY,del(11)(q21q24),del(13)(q13q22)<15>/46,idem,del(6)(q16q23)<3>/46,XY<2>	Présence d'une délétion 11q/ATM- associée à une délétion 13q Evolution clonale avec délétion 6q Caryotype complexe de haut risque dans le cadre des LLC
5	46,XY,del(20)(q11)<5>/46,XY<15>	Présence d'une délétion 20q dans 5/20 mitoses Anomalie non spécifique d'un lymphome
10	46,XY<20>	Absence d'anomalie chromosomique
12	46,XX<20>	Absence d'anomalie chromosomique
13	46,XY<20>	Absence d'anomalie chromosomique
14	47,XY,t(5;6)(q31;p22),t(14;18)(q32;q21),+der(18)t(14;18)<4>/46,XY<16>	Présence d'une translocation t(14;18) (confirmée par FISH) avec duplication du dérivé (18), dans 20 % des cellules Caryotype compatible avec une dissémination hématogène de lymphome folliculaire
18	46,XX,der(6)del(6)(q13q21)del(6)(q24q26),der(9)t(9;?10)(p12;p13),der(10)t(10;11)(p12;q21),der(11)t(9;11)(p12;q21),der(17)t(8;17)(q13;p11)<18>/46,XX<2>	Présence d'une délétion 6q associée à une translocation t(8;17) déséquilibrée générant un 17p-/TP53- et une trisomie 8q, et à un remaniement complexe entre les chromosomes 9, 10 et 11, dans 18/20 mitoses A noter, la présence de nombreuses anomalies non clonales témoin d'une instabilité chromosomique Caryotype compatible avec une LLC de mauvais pronostic
21	46,XX,t(11;18)(q21;q21)<20>/46,XX<1>	Présence d'une translocation t(11;18) dans 20/21 mitoses analysées Caryotype compatible avec un lymphome de MALT
23	46,XY<20>	Absence d'anomalie chromosomique détectée.
24	46,XY,del(7)(q22q36),?add(19)(p13)<16>/47,XY,+12<3>/47,sl,del(11)(q21q23)<2>	Présence de 2 clones indépendants : - un clone majoritaire de 16 mitoses comportant une délétion 7q - un clone de 5 mitoses comportant une trisomie 12 isolée dans 3 mitoses et associée à une délétion 11q/ATM- dans 2 mitoses, compatible avec une LLC Caryotype compatible avec une double pathologie lymphoïde
32	46,XX,t(13;16)(q14;q24)<20>	Présence d'une translocation t(13;16) générant une probable délétion 13q14 dans toutes les mitoses analysées Caryotype compatible avec une LLC
35	45,XY,+3,add(3)(p11),-19,-21,-22,+mar<9>/46,XY<11>	Présence d'un clone hypotriploïde à 45 chromosomes comportant une trisomie 3q associée à des monosomies 19, 21 et 22 et à un chromosome marqueur Caryotype compatible avec un Lymphome de la zone marginale
36	46,XY,del(13)(q14q14)<9>/46,XY<11>	Présence d'une délétion 13q dans 9/20 mitoses
39	47,XY,+12<9>/48,sl,+18<2>/46,XY<10>	Présence d'une trisomie 12 isolée dans 9/21 mitoses et associée à une trisomie 18 dans 2 mitoses Caryotype compatible avec une LLC
40	46,XY,t(3;7)(q12;q35)<2>/46,sl,del(13)(q11q21)<1>/46,XY,del(13)(q14q14)<3>/46,XY,del(13)(q13q22)<1>/46,XY<14>	Présence d'une délétion 13q de taille variable dans 7/20 mitoses Cette délétion est associée à une translocation t(3;7) dans 1 mitose et la translocation t(3;7) est présente de façon isolée dans 2 mitoses Caryotype compatible avec une LLC
45	46,XX,i(7)(q10)<2>/46,XX<18>	Présence d'un isochromosome 7q générant une trisomie 7q et une monosomie 7p, dans 2/20 mitoses Anomalie atypique dans un LNH-B
48	41,X,-X,dic(1;5)(q44;p15),der(8;17)(q10;q10),add(11)(p15),-13,add(13)(q34),-20,add(20)(q13)<3>/41,sl,-dic(1;5),+der(1;5)(1pter->1q23::1q12->1q44::5p15->5qter)<7>/46,XX<10>	Présence d'un clone hypodiploïde à 41 chromosomes comportant : - des monosomies X, 13 et 20, - des remaniements des chromosomes 1, 5, 8, 11, 13, 17 et 20 générant entre autre un 17p- Evolution clonale avec remaniement du dicentrique dic(1;5) générant une trisomie 1q partielle dans 7 mitoses Caryotype complexe compatible aussi bien avec une LLC atypique qu'un lymphome B

49	47,XY,+4,der(6)t(3;6)(q22;q26),i(8)(q13),add(21)(q22) <4>/47,sl,add(17)(p11),add(21),+21<3>/48,sdl,add(19) (q13),+mar<3>/46,sl,-4,add(12)(p12)<2>/46,XY<8>	Présence de 4 clones comportant en commun : - une trisomie 4, - une translocation t(3;6) déséquilibrée générant une trisomie 3q partielle, - un remaniement d'un chromosome 8 générant une trisomie 8q partielle Variations avec : - remaniement d'un chromosome 21 dans 4 mitoses, - un remaniement d'un 17 générant un 17p dans 3 mitoses associé à un remaniement d'un chromosome 19 et à un chromosome marqueur dans 3 mitoses, - perte d'un chromosome 4 et remaniement d'un chromosome 12 dans 2 mitoses.
53	46,XX,del(13)(q14q14)<10>/46,XX<11>	Caryotype complexe compatible avec un Waldenström Délétion 13q dans 10/21 mitoses Caryotype compatible avec une LLC

CLINICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CHRONIC B LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS WITH MORE THAN ONE ABERRANT CELL POPULATION AS DETECTED BY FLOW CYTOMETRY

B cell chronic lymphoproliferative disorders (B-CLPD) correspond to a clonal malignant B cell proliferation. They represent a relatively heterogeneous group of hematologic malignancies both by the nature of the malignant cells and the origin of the different entities that compose them than by specific therapeutic strategies or their variable prognosis.

In about 3 to 5% of the cases, two or three clonal B cell subsets can be found during an immunophenotype. These cases are called biclonal B-CLD, they are part of a larger group of hematologic disorders called composite lymphomas.

We carried out a retrospective study of 56 patients for whom an immunophenotype performed between January 2013 and the end of August 2016 showed two or more clonal B cell subsets.

For these patients we studied results from immunophenotype, karyotype and next generation sequencing (NGS) of the variable portion of the immunoglobulin heavy chain gene results, as well as clinical and other biological datas.

After a screening by flow cytometry, the absence of clonality was revealed by NGS in 3 cases out of 24. The presence of several clones could be confirmed in 4 cases, without need to sort the different monoclonal populations before analysis, and suspected in 8 cases. A clonal evolution with modification of the phenotype could be suspected in 5 cases. Finally, for the remaining 4 patients the origin remains uncertain.

These patients did not appear to be significantly different from patients with biological, clinical or prognostic monoclonal B-CLPD. Thus, there is no need for changing their therapeutic strategy.

KEY WORDS : chronic B lymphoproliferative disorders / lymphoma / composite lymphoma / biclonality / immunophenotyping / flow cytometry / next-generation sequencing (NGS) / chronic lymphocytic leukemia (CLL)

**CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES ET CLINIQUES DE SYNDROMES
LYMPHOPROLIFERATIFS CHRONIQUES B AVEC PLUS D'UN CLONE
DETECTES PAR CYTOMETRIE EN FLUX**

RESUME :

Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B matures (SLPC-B) correspondent à la prolifération maligne d'un clone lymphocytaire B. Ils représentent un groupe relativement hétérogène d'hémopathies malignes tant par la nature des cellules malignes et l'origine des différentes entités qui les composent que par les stratégies thérapeutiques spécifiques ou leur pronostic variable.

Dans environ 4 à 5% des cas, on peut retrouver lors d'un immunophénotypage deux ou trois populations B clonales. Ces cas sont appelés SLPC-B biclonaux, ils font partie d'un groupe plus large d'hémopathies appelées lymphomes composites.

Nous avons réalisé une étude rétrospective sur 56 patients pour lesquels un immunophénotypage effectué entre janvier 2013 et fin août 2016 a mis en évidence un nombre de populations clonales supérieur ou égal à deux. Pour ces patients nous avons étudié les données immunophénotypiques, les résultats issus du caryotype et du séquençage nouvelle génération (NGS) de la partie variable du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines ainsi que les données cliniques et biologiques.

Aucune clonalité n'a été mise en évidence par NGS dans 3 cas sur 24. La présence de plusieurs clones a pu être confirmée dans 4 cas, sans nécessité de trier les différentes populations monoclonales avant analyse, et suspectée dans 8 cas. Une évolution clonale avec modification du phénotype a été suspectée dans 5 cas. Enfin, pour les 4 derniers patients l'origine reste incertaine.

Ces patients ne semblent pas présenter de différence significative avec les patients présentant des SLPC-B monoclonaux du point de vue biologique, clinique ou pronostique. Il ne semble ainsi pas justifié de modifier leur prise en charge.

DISCIPLINE : Biologie médicale

MOTS-CLES : syndrome lymphoprolifératif chronique B / lymphome / lymphome composite / biclonalié / immunophénotypage lymphocytaire / cytométrie en flux / séquençage nouvelle génération (NGS) / leucémie lymphoïde chronique (LLC)

UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES DE BORDEAUX
146 rue Léo Saignat
33076 BORDEAUX