

N°

# **MEMOIRE**

## **DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES**

**de Biologie Médicale**

**soutenu le 11 octobre 2021**

**par M<sup>me</sup> Elise SOURDEAU**

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de :

# **THESE**

**POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE  
DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

---

**PROFIL PHENOTYPIQUE DES CELLULES TUMORALES  
DE LA MACROGLOBULINEMIE DE WALDENSTRÖM :  
DETERMINATION D'UN SCORE DIAGNOSTIQUE ET  
CORRELATIONS CLINICO-BIOLOGIQUES**

---

## **JURY**

**Présidente : Mme la Professeure Pascale GAUSSEM**

**Directrice : Mme la Docteure Magali LE GARFF-TAVERNIER**

**Membres : Mme la Professeure Valérie BARDET**

**Mme la Professeure Véronique LEBLOND**

**M. le Docteur Damien ROOS-WEIL**

**M. le Docteur Ludovic SUNER**

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à adresser mes sincères remerciements aux **membres du jury** qui ont accepté avec beaucoup d'enthousiasme de juger ce travail :

**Madame la Professeure Pascale GAUSSEM**, vous me faites un grand honneur d'en assurer la présidence. Vous êtes l'un des premiers professeurs à m'avoir fait découvrir le domaine si vaste et si complexe des maladies du sang. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma reconnaissance.

**Madame la Docteure Magali LE GARFF-TAVERNIER**, je te remercie d'avoir accepté d'encadrer ma thèse d'exercice. J'espère que ce travail est à la hauteur de tes espérances. Lorsque tu m'as confié ce projet, tu devais être loin de te douter de ma ténacité et du tour d'horizon que je lui réservais. Merci de m'avoir suivie et soutenue dans cette aventure, d'avoir toujours été présente avec tes conseils avisés. C'est une réelle chance pour moi d'avoir pu explorer une thématique chère à notre secteur d'activité, de pouvoir continuer à approfondir ce projet et le mettre en application dans ma pratique quotidienne. Après une première rencontre en septembre 2018 et quelques mails échangés, j'ai réussi à rejoindre ton équipe en novembre 2020 avec une entrée en matière rapide, formatrice et si enrichissante ! Je mesure chaque jour la chance que j'ai de travailler et d'apprendre à tes côtés. Ta disponibilité, ta bienveillance et ta patience sont des atouts majeurs qui constituent pour moi une source d'inspiration et un exemple à suivre. J'ai beaucoup à apprendre et j'espère t'accompagner encore plusieurs années.

**Madame la Professeure Valérie BARDET**, c'est un honneur pour moi que vous évaluiez ce travail, cinq ans après mon arrivée dans votre service en tant que toute jeune interne. Je vous remercie pour la vocation que vous avez créée en moi, pour les projets que vous m'avez confiés, que j'ai menés avec enthousiasme et que vous avez finalisés en valorisant toujours mon travail.

**Madame la Professeure Véronique LEBLOND**, vous me faites l'honneur de participer à ce jury, en tant qu'experte de la Macroglobulinémie de Waldenström. Je suis très impressionnée de vous présenter ce projet qui touche une maladie qui n'a plus de secret pour vous. Je vous prie de trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect et de ma reconnaissance.

**Monsieur le Docteur Damien ROOS-WEIL**, je te remercie pour la collaboration étroite que nous avons menée dans la réalisation de ce projet. J'espère vivement que nous continuerons d'échanger sur cette thématique et que nous pourrons développer de nouveaux projets ensemble.

**Monsieur le Docteur Ludovic SUNER**, merci pour tes conseils avisés dans le cadre du projet que nous avons mené ensemble à Saint-Antoine. J'espère que cette thématique non myéloïde te plaira également.

Je remercie toutes les **personnes qui ont contribué à ce projet de thèse** : en premier lieu l'équipe de cytométrie en flux de l'UF Phénotypage des Hémopathies qui prennent en charge au quotidien les immunophénotypes des patients et sans qui ce travail ne pourrait exister, les cliniciens - notamment Clémentine et Marine – avec qui j'ai collaboré et qui m'ont donné accès à la base de données cliniques, Christophe et Samuel pour leurs conseils lors de mes réflexions sur les analyses de cytométrie, Catherine pour son accueil sur la plateforme CyPS

et Aurélien pour son implication dans le projet et pour m'avoir fait découvrir le monde des analyses non supervisées. J'espère que nous pourrons continuer à travailler ensemble.

Je remercie vivement Olivier Munoz de la société BD Biosciences qui a accepté de m'aider à construire un tube 12 couleurs pour réaliser des tests dans les perspectives de ce projet.

**Agathe**, travailler avec toi est une immense chance. Merci d'avoir une oreille attentive, même si parfois nos conversations ralentissent le rythme soutenu de tes journées. Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance, tes conseils et ton aide précieuse dans la relecture de ce projet, bien que cela fasse partie de « ton métier » !

**Marine**, merci infiniment pour le temps que tu y as consacré dans la toute dernière ligne droite et pour les conseils que tu m'as prodigués. Ta relecture attentive de ce manuscrit n'a pu qu'apporter une « forte valeur ajoutée » à ce travail !

Je remercie **l'ensemble des biologistes, cliniciens, techniciens, ingénieurs, scientifiques** croisés au cours de mes neuf semestres d'internat et de Master 2, de l'Hôpital Ambroise-Paré à l'Hôpital Pitié-Salpêtrière. Tous ces professionnels m'ont permis d'apprendre le métier de biologiste, grâce à leur pédagogie, au partage de leurs connaissances et de leurs expériences. Ma formation d'interne a été rythmée par chacune de ces rencontres. Sans oublier les personnes rencontrées lors de mon imprévisible détour par l'Hôtel-Dieu, en mars 2020, où je me suis pleinement investie pendant deux mois et demi, et qui restera une expérience humaine et professionnelle mémorable.

**Emily**, merci pour ta gentillesse, ta pédagogie et ta bonne humeur. Tu es l'une des premières biologistes à m'avoir prise sous ton aile et à m'avoir fait partager ta passion de l'Hématologie. Tu as construit le socle de mes connaissances en cytologie et je ne peux que te remercier infiniment de m'avoir transmis une partie de ton savoir.

**Jaja**, les cinq lettres du mot « M.E.R.C.I. » ne suffisent pas à résumer tous nos échanges et le chemin parcouru depuis notre premier jour en tant que nouvelles de la « Maison » Ambroise-Paré : merci pour ta gentillesse et ton écoute, je te suis très reconnaissante pour ta disponibilité et tes conseils si précieux, tu es une source d'inspiration par ton énergie débordante, tes connaissances et l'investissement que tu mets dans ton travail.

Merci à mes **amis de la Faculté de Pharmacie** et à mes **co-internes** pour tous les moments partagés, en particulier Laura, Pauline, Marion, Claire, Marie, Lou, Marianne...

**Viviane**, merci pour ta bienveillance et tes conseils. Tu m'as mise en confiance pour la réalisation des myélogrammes qui n'ont plus de secret pour moi !

**Amélie**, merci pour ton écoute, ta gentillesse et ta générosité.

**Clara**, le Master 2 nous a permis de nous rencontrer et de partager d'agréables moments entre Paris et Nantes !

A toutes les trois, merci pour votre amitié et votre soutien dans cette dernière ligne droite de l'internat. J'espère vivement continuer à échanger et partager de bons moments avec chacune d'entre vous !

Mes derniers remerciements vont à **mes parents et à toute ma famille**. Votre présence à mes côtés, vos encouragements et votre soutien sans limite me donnent la force d'avancer et de mener à bien mes projets.

Un clin d'œil tout particulier à mes neveux. Leur présence, leur joie de vivre et leur dynamisme me reboostent instantanément.

Maman, MERCI pour tout.

Je vous aime !

## **TABLE DES MATIERES**

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>2</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>6</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	<b>7</b>
<b>TABLE DES ANNEXES</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>9</b>
<b>I. GENERALITES SUR LA MACROGLOBULINEMIE DE WALDENSTRÖM</b> .....	<b>9</b>
I.1. Historique .....	9
I.2. Définition .....	9
I.3. Epidémiologie.....	9
I.4. Facteurs de prédisposition .....	10
I.5. Physiopathologie de la MW.....	10
I.5.1 Origine de la cellule tumorale .....	10
I.5.2 Génétique et épigénétique .....	11
I.5.2.1. Anomalies cytogénétiques.....	11
I.5.2.2. Mutation du gène <i>MYD88</i> .....	11
I.5.2.3. Mutation du gène <i>CXCR4</i> .....	12
I.5.2.4. Autres anomalies moléculaires et épigénétiques.....	14
I.5.3 Microenvironnement médullaire.....	14
I.6. Présentation clinique.....	15
I.6.1 Circonstances de découverte .....	15
I.6.2 Manifestations liées à l'infiltration tumorale .....	15
I.6.3 Manifestations liées aux propriétés physicochimiques de l'IgM.....	15
I.6.4 Manifestations auto-immunes .....	16
I.7. Diagnostic biologique .....	17
I.7.1 Critères diagnostiques .....	17
I.7.2 Immunochimie.....	17
I.7.3 Examens médullaires.....	17
I.8. Prise en charge thérapeutique des patients.....	19
I.8.1 Indications de traitement.....	19
I.8.2 Différentes options thérapeutiques .....	19
I.8.2.1. Traitements de première ligne .....	19
I.8.2.2. Traitement de la rechute .....	20
I.9. Facteurs pronostiques.....	21
<b>II. PLACE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LA MW</b> .....	<b>22</b>
II.1. Généralités.....	22
II.2. Marqueurs phénotypiques fréquemment étudiés dans la MW.....	23
II.3. Profil phénotypique de la MW .....	24
II.3.1 Caractérisation phénotypique des LyB tumoraux .....	24
II.3.2 Caractérisation phénotypique du clone plasmocytaire et des lymphoplasmocytes .....	26
II.3.3 Hétérogénéité phénotypique.....	27
II.4. Utilité pour le diagnostic différentiel .....	27
II.4.1 GMSI à IgM.....	27
II.4.2 Principaux SLP-B sécrétant une IgM .....	28
II.4.2.1. Introduction .....	28
II.4.2.2. Le LZM splénique .....	28
II.4.2.3. Le LF.....	29
II.4.2.4. La LLC .....	29
II.4.2.5. Le LCM .....	30
II.4.2.6. Le MM à IgM.....	30
II.5. Autres applications potentielles de la CMF dans la MW .....	30
II.5.1 Valeur pronostique de l'immunophénotypage.....	30
II.5.2 Suivi de la maladie résiduelle .....	31
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b> .....	<b>31</b>

<b>PATIENTS ET METHODES.....</b>	<b>32</b>
<b>I. DESCRIPTION DES COHORTES.....</b>	<b>32</b>
I.1. Présentation générale .....	32
I.2. Cohortes pour le profil phénotypique de la MW .....	32
I.3. Cohortes pour le score phénotypique médullaire et sanguin .....	33
I.4. Cohortes pour les corrélations clinico-bio-phénotypiques.....	33
<b>II. ANALYSES PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....</b>	<b>34</b>
II.1. Anticorps utilisés au laboratoire .....	34
II.2. Stratégie d'analyse des LyB pathologiques .....	36
II.2.1 Stratégie de fenêtrage .....	36
II.2.2 Interprétation des pourcentages et intensités de fluorescence.....	38
II.2.3 Estimation du pourcentage de plasmocytes .....	38
II.2.4 Définition d'un profil FMC7/CD38 .....	39
<b>III. ANALYSES DES DONNEES .....</b>	<b>40</b>
III.1. Analyses non supervisées .....	40
III.2. Analyses statistiques.....	41
<b>RESULTATS.....</b>	<b>42</b>
<b>I. PHENOTYPE DES LYMPHOCYTES B PATHOLOGIQUES DANS LA MW .....</b>	<b>42</b>
I.1. Vue d'ensemble des marqueurs étudiés avant 2015.....	42
I.2. Evaluation des immunophénotypages réalisés depuis 2015 .....	43
I.2.1 Impact de l'effet temps sur les résultats d'immunophénotypage .....	43
I.2.2 Antigènes étudiés à la surface des LyB.....	43
I.2.2.1. Expression phénotypique du CD19 .....	44
I.2.2.2. Marqueurs majoritairement négatifs dans la MW .....	44
I.2.2.3. Marqueurs majoritairement positifs dans la MW.....	45
I.2.3 Hétérogénéité du profil FMC7/CD38.....	53
I.2.4 Analyses non supervisées des données phénotypiques .....	55
<b>II. DETERMINATION ET APPLICATION DU SCORE PHENOTYPIQUE DE LA MW .....</b>	<b>58</b>
II.1. Sélection des patients .....	58
II.2. Construction du score phénotypique médullaire de la MW.....	59
II.2.1 Paramètres significatifs en analyses univariées .....	59
II.2.2 Analyses multivariées .....	59
II.2.2.1. Régression logistique sur les marqueurs significatifs .....	59
II.2.2.2. Application d'un modèle de prédiction et ACP.....	60
II.2.3 Choix des marqueurs d'intérêt.....	61
II.2.4 Seuil de positivité et performances du score .....	62
II.3. Comparaison des résultats phénotypiques médullaires et sanguins .....	63
II.4. Score phénotypique sanguin de la MW .....	65
II.4.1 Optimisation du score pour l'étude du compartiment sanguin .....	65
II.4.2 Seuil de positivité et performances du score sanguin.....	66
II.4.3 Prévalence des clones sanguins .....	67
II.5. Application du score phénotypique .....	68
II.5.1 Autres SLP-B avec un score de Matutes $\leq 3$ .....	68
II.5.2 Formes frontières entre MW et LZM .....	68
II.5.3 GMSI à IgM.....	68
<b>III. CORRELATIONS CLINICO-BIO-PHENOTYPIQUES DANS LA MW .....</b>	<b>69</b>
III.1. Paramètres corrélés avec l'infiltration médullaire.....	69
III.2. Paramètres corrélés avec les marqueurs phénotypiques : importance du CD38 .....	70
III.3. Profil phénotypique spécifique des mutations de CXCR4.....	72
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>73</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>85</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>86</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>91</b>

## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

Figure 1 : Altérations génomiques récurrentes et dérégulation des principales voies de signalisation impliquées dans la MW. ....	12
Figure 2 : Voies de signalisation déclenchées par l'activation du récepteur CXCR4.....	13
Figure 3 : Analyse histologique d'une BOM de patient atteint de MW. ....	17
Figure 4 : Cytologie médullaire d'un patient ayant une MW. ....	18
Figure 5 : Découvertes les plus importantes en CMF dans la MW .....	22
Figure 6 : Immunophénotype du clone de la MW avec le profil des LyB pathologiques (A) et des plasmocytes pathologiques (B) .....	25
Figure 7 : Profil antigénique de la différenciation lymphocytaire B dans le sang périphérique. ....	26
Figure 8 : Répartition des immunophénotypes des patients selon les objectifs de l'étude. ....	32
Figure 9 : Stratégie d'analyse des LyB par des représentations bi-paramétriques.....	37
Figure 10 : Estimation du pourcentage de plasmocytes. ....	39
Figure 11 : Représentation bi-paramétrique FMC7/CD38 sur les LyB normaux.....	39
Figure 12 : Exemple d'ACP des données phénotypiques du groupe de patients ayant une MW. ....	40
Figure 13 : Expression de seize marqueurs phénotypiques à la surface des LyB CD19 <sup>+</sup> . ....	42
Figure 14 : Evaluation des variations phénotypiques selon les années.....	43
Figure 15 : Expression du CD19 à la surface des LyB normaux et pathologiques. ....	44
Figure 16 : Expression du CD5, CD23 et CD43 à la surface des LyB normaux et pathologiques.....	45
Figure 17 : Expression du CD20 à la surface des LyB normaux et pathologiques. ....	46
Figure 18 : Expression du CD79b à la surface des LyB normaux et pathologiques. ....	46
Figure 19 : Expression des chaînes légères à la surface des LyB pathologiques. ....	47
Figure 20 : Expression du FMC7 à la surface des LyB normaux et pathologiques.....	48
Figure 21 : Expression du CD38 à la surface des LyB normaux et pathologiques. ....	49
Figure 22 : Expression du CD22 à la surface des LyB normaux et pathologiques. ....	50
Figure 23 : Expression du CD27 à la surface des LyB normaux et pathologiques. ....	51
Figure 24 : Expression du CD13 à la surface des LyB normaux et pathologiques. ....	51
Figure 25 : Expression du CD25 à la surface des Ly chez un patient ayant une MW. ....	52
Figure 26 : Exemples de profils FMC7/CD38 observés sur les LyB pathologiques dans la MW. ....	53
Figure 27: Répartition des profils FMC7/CD38 observés sur les LyB selon les groupes.....	54
Figure 28 : Exemple de profils FMC7/CD38 observés sur les LyB par groupe d'étude hors MW.....	54
Figure 29 : Analyse non supervisée des marqueurs phénotypiques du tube n°4 entre les groupes MW et LZM. ....	56
Figure 30 : Analyse non supervisée des marqueurs phénotypiques du tube n°5 entre les groupes MW et LZM. ....	57
Figure 31 : Résultats du score de Matutes pour les différents SLP-B étudiés. ....	58
Figure 32 : Expression des marqueurs phénotypiques entre la MW et le LZM.....	59
Figure 33 : Performances du modèle prédit par l'algorithme <i>Random Forest</i> .....	60
Figure 34 : Profils phénotypiques de la MW (n=86) et du LZM (n=40). ....	61
Figure 35 : Phénotype médullaire d'un patient ayant une MW avec un score égal à six points. ....	61
Figure 36 : MFI du FMC7/CD38 et CD79b/CD22 sur les LyB pathologiques. ....	62
Figure 37 : Performances du score phénotypique médullaire.....	62
Figure 38 : Résultats de l'application du score phénotypique médullaire. ....	63
Figure 39 : Comparaison des résultats phénotypiques médullaires et sanguins. ....	64
Figure 40 : Expression du FMC7 dans le sang. ....	65
Figure 41 : Comparaison des taux de Ly sanguins et des pourcentages de LyB pathologiques entre la MW et le LZM. ....	65
Figure 42 : Phénotype sanguin d'un patient atteint d'une MW avec un score à sept points. ....	66
Figure 43 : Performances du score phénotypique sanguin. ....	66
Figure 44 : Résultats de l'application du score phénotypique sanguin. ....	67
Figure 45 : Expression du CD38 en fonction de l'infiltration médullaire par les LyB pathologiques et du statut mutationnel de <i>CXCR4</i> (n=74) .....	71
Figure 46 : Expression du CD38 selon la présence ou non d'une mutation de <i>CXCR4</i> . ....	71
Figure 47 : Etude phénotypique selon le statut mutationnel de <i>CXCR4</i> . ....	72
Figure 48 : Synthèse des hypothèses et observations faites entre CD38 et <i>CXCR4</i> dans la MW. ....	83

## **TABLE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Score ISSWM établi pour les patients symptomatiques.....	21
Tableau 2 : Score ISSWM révisé pour les patients symptomatiques.....	21
Tableau 3 : Caractéristiques physiologiques des antigènes d'intérêt évalués au laboratoire pour le diagnostic de la MW.....	23
Tableau 4 : Caractéristiques phénotypiques des SLP-B dont le diagnostic différentiel avec la MW peut se poser.....	28
Tableau 5 : Présentation des groupes étudiés pour déterminer le phénotype de la MW.....	33
Tableau 6 : Combinaisons des anticorps utilisés pour le dépistage d'une MW.....	34
Tableau 7 : Caractéristiques des anticorps utilisés pour le dépistage d'une MW.....	35
Tableau 8 : Caractéristiques des anticorps anti-CD25 étudiés.....	35
Tableau 9 : MFI du CD79b et des chaînes légères à la surface des LyB normaux.....	48
Tableau 10 : Caractéristiques biologiques des patients MW et LZM.....	58
Tableau 11 : Régressions logistiques des paramètres significatifs en analyse univariée.....	59
Tableau 12 : Matrice de confusion obtenue à partir de l'algorithme <i>Random Forest</i> .....	60
Tableau 13 : Score phénotypique médullaire de la MW sur six paramètres.....	61
Tableau 14 : Score phénotypique sanguin défini sur sept paramètres.....	66
Tableau 15 : Résultat du score phénotypique pour les SLP-B avec un score de Matutes $\leq 3$ .....	68
Tableau 16 : Résultats immunochimiques et phénotypiques d'une cohorte de GMSI à IgM avec ou sans neuropathie anti-MAG.....	69

## **TABLE DES ANNEXES**

Annexe 1 : Résultats phénotypiques des patients selon les différents groupes.....	91
Annexe 2 : Comparaisons statistiques du groupe MW avec chaque groupe selon les marqueurs phénotypiques.....	92
Annexe 3 : Hétérogénéité des marqueurs phénotypiques dans la MW (n=86).....	93
Annexe 4 : Corrélations entre les pourcentages d'antigènes étudiés dans la MW (n=86).....	93
Annexe 5 : Répartition des profils phénotypiques selon certains paramètres clinico-biologiques.....	94
Annexe 6 : Comparaison de paramètres biologiques et phénotypiques selon le statut mutationnel de <i>CXCR4</i> dans la MW (n=74).....	94

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ACP : Analyse en composantes principales  
ASC : Aire sous la courbe  
BOM : Biopsie ostéo-médullaire  
BCR : Récepteur à l'antigène du lymphocyte B  
CD : *Cluster* de différenciation  
CMF : Cytométrie en flux  
CXCR4 : CXC-Chemokine Receptor-4  
EPS : Électrophorèse des protéines sériques  
FISH : Hybridation fluorescente *in situ* (*Fluorescence In Situ Hybridization*)  
FSC : *Forward Scatter*  
GMSI : Gammopathie monoclonale de signification indéterminée  
IgM : Immunoglobuline M  
IL : Interleukine  
LCM : Lymphome à cellules du manteau  
LF : Lymphome folliculaire  
LLC : Leucémie lymphoïde chronique  
LLP : Lymphome lymphoplasmocytaire  
Ly : Lymphocytes  
LZM : Lymphome de la zone marginale  
MFI : Intensité moyenne de fluorescence (*Mean Fluorescence Intensity*)  
MM : Myélome multiple  
MO : Moelle osseuse  
MW : Macroglobulinémie de Waldenström  
MYD88 : *Myeloid Differentiation primary response 88*  
NFS : Numération et formule sanguine  
RFI : Ratio d'intensité de fluorescence (*Ratio Fluorescence Intensity*)  
Se : Sensibilité  
SG : Survie globale  
SLP-B : Syndrome lymphoprolifératif chronique B  
Sp : Spécificité  
SSC : *Side scatter*  
SSP : Survie sans progression  
VPP : Valeur prédictive positive  
VPN : Valeur prédictive négative



## **INTRODUCTION**

### **I. GENERALITES SUR LA MACROGLOBULINEMIE DE WALDENSTRÖM**

#### **I.1. Historique**

La Macroglobulinémie de Waldenström (MW) a été décrite pour la première fois en 1944 par Jan Gösta Waldenström qui rapporta les observations de deux patients présentant des épistaxis, adénopathies, une anémie normochrome associée à une thrombopénie, fibrinogénopénie, hypergammaglobulinémie et une infiltration médullaire par des cellules lymphoïdes (1). La caractérisation des différentes classes d'immunoglobuline (Ig) et le concept d'Ig monoclonale ont permis l'individualisation de cette entité clinique ultérieurement.

#### **I.2. Définition**

La MW est un syndrome lymphoprolifératif chronique B (SLP-B), non Hodgkinien, caractérisé par l'infiltration de la moelle osseuse (MO) par un *continuum* de différenciation lymphocytaire composé de lymphocytes (Ly), lymphoplasmocytes et plasmocytes qui sécrètent une immunoglobuline M (IgM) monoclonale qui s'accumule dans le sang. D'après la classification des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2008 et révisée en 2016 (2), la MW appartient à la classe des hémopathies lymphoïdes de bas grade de phénotype B, de type lymphome lymphoplasmocytaire (LLP). Le LLP est défini comme une prolifération de LyB, lymphoplasmocytes et plasmocytes, impliquant la MO, parfois les ganglions lymphoïdes et la rate, et qui ne remplit pas les critères des autres hémopathies à petites cellules B avec différenciation lymphoplasmocytaire. La MW apparaît donc comme un sous-groupe majoritaire de LLP, seuls 5% des LLP sont associés à une Ig monoclonale A, G ou sont non sécrétants.

#### **I.3. Epidémiologie**

La MW est une hémopathie rare, qui ne représente que 1 à 2% des hémopathies malignes et 6% des SLP-B. L'incidence annuelle varie selon les pays et augmente avec l'âge. Elle est estimée à 3,4 cas par million d'habitants chez l'homme et à 1,7 cas par million d'habitants chez la femme aux Etats-Unis contre 7,3 et 4,2 cas par million d'habitants respectivement dans la population européenne (3,4). Seuls 5% des patients sont Africains et cette maladie est rare chez les sujets asiatiques. C'est une hémopathie du sujet âgé, avec un âge médian au diagnostic égal à 72 ans (allant de 63 à 75 ans selon les études), moins d'1% des patients sont diagnostiqués avant 40 ans (5,6).

En raison de critères diagnostiques restés longtemps mal définis et de l'existence de formes asymptomatiques, cette incidence est sous-estimée, particulièrement chez les sujets âgés. Des démarches sont ainsi en cours au sein du groupe coopérateur FILO (*French Innovative Leukemia Organization*) pour la création d'un registre de la MW en France.

#### **I.4. Facteurs de prédisposition**

L'étiologie de la MW reste inconnue, les cas sont majoritairement sporadiques. Cependant, l'existence de formes familiales est rapportée depuis plusieurs années avec une incidence relativement élevée, certaines études indiquant qu'environ 20% des patients atteints de MW ont au moins un parent de premier degré ayant un SLP-B (7). Une forme familiale doit systématiquement être recherchée chez un sujet jeune car il existe des phénomènes d'anticipation. Certains désordres dysimmunitaires, infectieux, allergiques ou inflammatoires ainsi que des facteurs génétiques semblent impliqués dans la pathogénèse de la MW (8). Principal facteur de risque, la présence d'une gammopathie monoclonale de signification indéterminée (GMSI) d'isotype IgM, confère un risque 287 fois plus élevé de développer une MW. Le risque de progression vers une hémopathie lymphoïde (MW ou un SLP-B de bas grade) a été estimé à 2% par an durant les dix premières années puis 1% par an. Ce risque est d'autant plus élevé que le taux d'IgM est supérieur à 15 g/L et que le ratio des chaînes légères libres est anormal (9).

#### **I.5. Physiopathologie de la MW**

##### **I.5.1 Origine de la cellule tumorale**

L'origine de la cellule tumorale n'est pas encore parfaitement définie (10). Le phénotype des cellules tumorales ainsi que la nature et la distribution des mutations somatiques mettent en évidence que les LyB pathologiques sont bloqués partiellement dans leur processus de développement après passage dans le centre germinatif, et avant la différenciation terminale en plasmocytes. L'origine de la cellule de MW pourrait donc être un LyB mémoire IgM<sup>+</sup> et/ou IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> (11), ayant subi l'étape d'hypermutations somatiques (pour environ 90% des patients) et présentant un déficit dans l'initiation de la commutation isotypique (12). Des études transcriptomiques ont mis en évidence des anomalies d'expression de gènes impliqués dans la différenciation terminale des LyB en plasmocytes. Les LyB pathologiques présenteraient une plus grande proximité avec les LyB matures qu'avec les plasmocytes (13,14). Les signatures phénotypiques et moléculaires du clone Waldenström sont déjà présentes au stade GMSI à IgM. Le stade MW symptomatique résulterait de la transformation des LyB clonaux suite à l'acquisition d'anomalies génétiques supplémentaires (15,16).

## I.5.2 Génétique et épigénétique

### I.5.2.1. Anomalies cytogénétiques

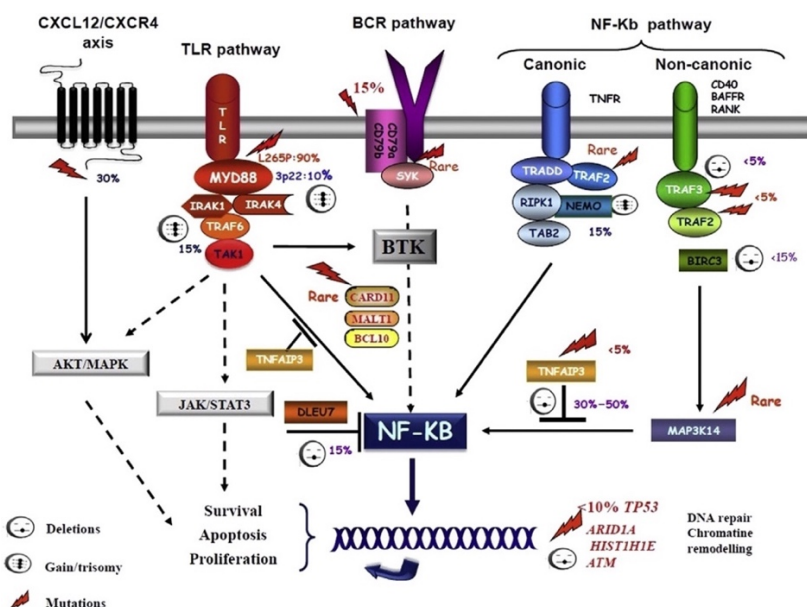
Des anomalies chromosomiques récurrentes, non spécifiques de la MW, sont détectées chez environ 45 à 50% des patients, par caryotype conventionnel et/ou hybridation fluorescente *in situ* (FISH) (17). Leur fréquence diffère de celle observée dans les autres SLP-B. La plus commune est la délétion d'une partie du bras long du chromosome 6 (del6q) impliquant la région q21-25, dans 30 à 50% des cas (17,18). La recherche d'une anomalie fondatrice de la MW dans la région 6q a permis d'identifier deux gènes suppresseurs de tumeur potentiellement impliqués dans la pathogenèse de la MW : *BLIMP1* en 6q21 qui régule la différenciation plasmocytaire et *TNFAIP3* en 6q23 (19). Les autres anomalies retrouvées pour moins de 15% des patients sont la trisomie 18, la délétion d'une partie du bras long du chromosome 13 (del13q14), la trisomie 4, la délétion d'une partie du bras court du chromosome 17 (del17p13, comportant le gène *TP53*), la délétion d'une partie du bras long du chromosome 11 (del11q22, impliquant le gène *ATM*) et la trisomie 12. Au sein des SLP-B, la présence d'une trisomie 4 n'a été retrouvée que dans la MW. Un caryotype complexe est présent pour environ 30% des patients (17).

### I.5.2.2. Mutation du gène MYD88

Les progrès en biologie moléculaire avec notamment le séquençage du génome ont permis de mettre en évidence des mutations récurrentes dans la MW. MYD88 (*Myeloid Differentiation primary response 88*) est une molécule adaptatrice jouant un rôle dans la signalisation induite par les récepteurs *toll-like* et les récepteurs à l'interleukine (IL)-1 (Figure 1). L'activation de ces récepteurs permet le recrutement de MYD88 par la voie de la Tyrosine Kinase de Bruton (BTK). Elle se lie à IRAK1/IRAK4 pour former un complexe appelé « myddosome » qui active la signalisation du facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B). Ce dernier joue un rôle important dans la survie et la croissance des cellules.

Une mutation somatique dans le gène *MYD88* est présente chez 90 à 95% des patients ayant une MW, la plus fréquente étant une substitution d'une thymine par une cytosine (c.794T>C), aboutissant au remplacement d'une leucine par une proline au niveau de l'acide aminé 265 (p.L265P) (20). Cette mutation gain de fonction induit l'homodimérisation et l'activation constitutive de MYD88. Elle entraîne également une suractivation de la voie NF- $\kappa$ B, indépendante d'IRAK1/IRAK4, par phosphorylation et activation constitutive de la BTK, elle-même responsable d'une activation oncogénique de la signalisation du récepteur à l'antigène du LyB (BCR), favorisée par la présence des mutations de *CD79A/CD79B* rencontrées dans la MW.

NF-κB induit la transcription de gènes codant pour l'IL-6 et la kinase des cellules hématopoïétiques. Cette dernière contribue à la prolifération et la survie des cellules de la MW et peut également être activée par une boucle autocrine *via* l'IL-6 (21). Les mutations de *MYD88* activent également la voie de la Janus kinase (JAK), responsable de la phosphorylation et de la dimérisation du facteur de transcription STAT3, à l'origine de la sécrétion d'IL-6 (22).



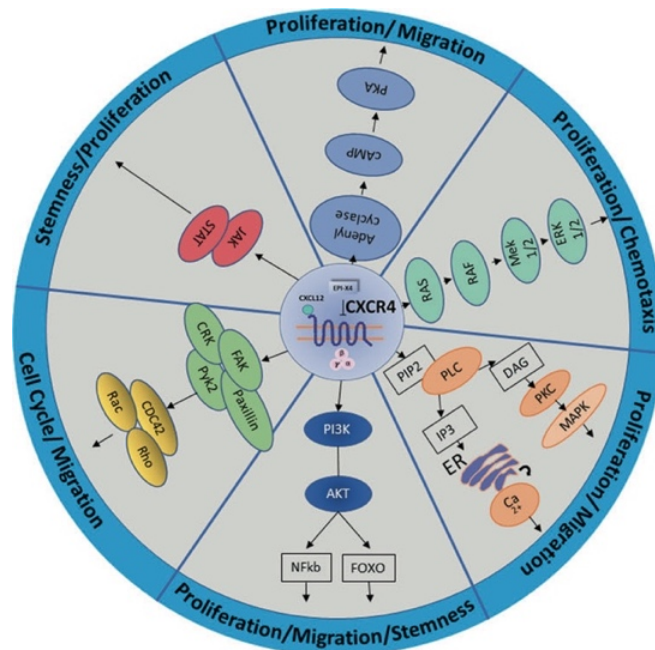
**Figure 1 :** Altérations génomiques récurrentes et dérégulation des principales voies de signalisation impliquées dans la MW (23).

Initialement décrite dans les lymphomes B diffus à grandes cellules principalement de type ABC (cellules B activées), la mutation *MYD88*<sup>L265P</sup> n'est pas spécifique de la MW. Elle est présente dans 70% des lymphomes cérébraux primitifs, 10% des lymphomes de la zone marginale (LZM) et 2 à 3% des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), souvent mutées pour le gène *IGVH* codant pour la chaîne lourde des Ig. Elle est absente des cellules de myélome multiple (MM). Cette mutation est également présente chez plus de 70% des patients ayant une GMSI à IgM, indiquant son rôle d'événement oncogène précoce de la MW (24–26). Représentant moins de 5% des cas de MW, d'autres mutations de *MYD88* ont été décrites telles que les mutations S219C, M232T et S243N (22,27).

### 1.5.2.3. Mutation du gène CXCR4

Le récepteur de chimiokine de type 4 (CXCR4), exprimé à la surface de la plupart des cellules hématopoïétiques, joue un rôle essentiel dans la rétention et le renouvellement du pool de cellules souches hématopoïétiques dans la niche médullaire. Membre clé de la famille des chémorécepteurs dans l'hématopoïèse, CXCR4 assure également la survie, la migration et l'adhésion des cellules au stroma médullaire par son interaction avec le ligand CXCL12, sécrété par les cellules stromales (28,29).

Différentes voies de signalisation sont activées par CXCR4 (Figure 2), notamment les voies PI3K-AKT et MAP-kinases, qui favorisent la résistance à l'apoptose et la survie cellulaire (30).



**Figure 2** : Voies de signalisation déclenchées par l'activation du récepteur CXCR4 (29).

CXCR4 est le gène le plus fréquemment muté après *MYD88*, dans 30 à 40% des cas de MW. Plus de 40 mutations ont été décrites, toutes présentes en position carboxy-terminale, entre les acides aminés 308 et 352 du domaine cytosolique régulateur, responsable de l'internalisation du récepteur CXCR4 (31). Dans 50% des cas, ces mutations touchent la sérine 338 avec la substitution d'une cytosine en guanine (c.1013C>G, 54% des cas) ou d'une cytosine en adénine (c.1013C>A, 25% des cas), responsables de l'apparition d'un codon stop (mutation non-sens p.S338X), ou une mutation faux-sens (21% des cas). Toutes les mutations sont activatrices et entraînent un défaut d'internalisation et de dégradation de CXCR4, à l'origine d'une activation persistante du signal médié par la fixation de CXCL12. La mutation non-sens *CXCR4*<sup>S338X</sup> prolonge le signal induit par les MAP-kinases, responsable d'une charge tumorale plus élevée que les mutations faux-sens. Ces mutations confèrent ainsi aux cellules tumorales un avantage de prolifération, de survie et de migration vers le compartiment médullaire. Le plus souvent secondaires, elles apparaissent dans le clone muté pour le gène *MYD88* (32) et sont rarement présentes chez les patients non mutés pour ce gène. La présence d'une mutation de *CXCR4* est rare au stade de GMSI à IgM et est associée à une évolution plus rapide en MW symptomatique, suggérant que son acquisition pourrait entraîner une évolution vers une forme plus agressive au sein d'un clone muté pour le gène *MYD88* (33). Les patients mutés pour *MYD88* et *CXCR4* ont moins d'adénopathies, une infiltration médullaire plus importante, un taux sérique d'IgM plus élevé, des cytopénies plus profondes et présentent souvent une hyperviscosité (34), en accord avec le rôle de CXCR4 dans l'adressage médullaire.

#### I.5.2.4. Autres anomalies moléculaires et épigénétiques

Plusieurs études ont révélé la présence d'autres anomalies moléculaires récurrentes chez des patients ayant une MW (35–41). Elles concernent principalement les gènes *KMT2D*, *ARID1A*, *TP53*, *CD79A/CD79B*, *HIST1H1E*, *MYBBP1A*, *TBL1XR1* et *SPI1*. Des altérations du nombre de copies avec des délétions notamment de *LYN*, *PRDM2*, *ARID1B* et *BTG1* ont également été mises en évidence. Les mécanismes physiopathologiques induits par ces anomalies moléculaires et leur impact pronostic sont actuellement mal connus. De plus, les cellules tumorales présentent une anomalie de certains microARN, suggérant un rôle dans la pathogénèse de la MW. La perte du miARN-9\* serait responsable d'une hypoacétylation des histones par activation des histones désacétylases dans les cellules de MW (42). A l'inverse, l'augmentation de l'expression de miR-155, connu comme régulateur oncogénique, favorise la croissance et la prolifération des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (43). Plus récemment, Roos-Weil et coll. ont proposé une séparation des patients MW en deux groupes, selon leur profil de méthylation de l'ADN, avec des caractéristiques phénotypiques, moléculaires et cliniques distinctes : le premier groupe présente un profil de LyB mémoires et le second un profil de cellules plasmocytaires, caractérisé par une hypométhylation globale (44).

#### I.5.3 Microenvironnement médullaire

Le microenvironnement médullaire intervient dans la pathogénèse et la prolifération des cellules tumorales par l'intermédiaire d'interactions entre les cellules ou par la sécrétion de chimiokines, cytokines ou métabolites (45,46). Une augmentation du nombre de mastocytes, sans anomalie phénotypique, est rapportée pour 26% des patients atteints de MW. Grâce à l'expression constitutive du ligand de CD40 (CD40L), ils soutiennent la croissance tumorale en stimulant la prolifération de LyB et la sécrétion d'Ig *via* le couple CD40-CD40L (47). Les cellules tumorales sont responsables de la production de CD27 soluble qui, par interaction avec le CD70 exprimé par les mastocytes, entraîne une stimulation de l'expression du CD40L (48). De plus, les cellules stromales produisent l'IL-6 qui se fixe sur les cellules tumorales et active la voie de signalisation JAK-STAT3, elle-même responsable d'une stimulation de la production d'IL-6. Cette boucle d'amplification se manifeste par la présence d'un syndrome inflammatoire. Sécrétée par le stroma médullaire, CXCL12 interagit avec CXCR4 et d'autres récepteurs et joue ainsi un rôle essentiel dans la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules tumorales au stroma médullaire. La production de VEGF par les LyB tumoraux stimule les cellules endothéliales et augmente la sécrétion d'IL-6, se traduisant par une augmentation de la densité des micro-vaisseaux médullaires chez 30 à 40% des patients, sans impact sur la survie (49). Enfin, les cellules tumorales semblent échapper au système immunitaire par expression du ligand PD1 qui interagit avec son récepteur PD1 présent sur les LyT (46).

## **I.6. Présentation clinique**

### I.6.1 Circonstances de découverte

La MW a une présentation clinique hétérogène pouvant induire une démarche diagnostique complexe. Une forme indolente sans manifestation clinique est retrouvée dans 30 à 50% des cas. La maladie est ainsi souvent de découverte fortuite. Les autres patients présentent des manifestations cliniques liées à l'infiltration tumorale, aux propriétés physicochimiques et/ou à l'activité auto-anticorps de l'IgM monoclonale, l'ensemble des mécanismes pouvant exister simultanément. Les signes généraux (fièvre, sueurs nocturnes, amaigrissement, altération de l'état général) ne sont pas spécifiques.

### I.6.2 Manifestations liées à l'infiltration tumorale

Les principaux symptômes sont des cytopénies dont la plus fréquente (60% des patients) est l'anémie normocytaire normochrome arégénérative d'origine multifactorielle (insuffisance médullaire, anémie hémolytique, hémodilution liée au pic IgM, syndrome inflammatoire par sécrétion de cytokines bloquant l'érythropoïèse). Une thrombopénie et une neutropénie peuvent également être retrouvées chez respectivement 16% et 3% des patients. Contrairement aux autres SLP-B, les patients présentent plus rarement un syndrome tumoral clinique (polyadénopathie périphérique, splénomégalie et/ou hépatomégalie dans 20% des cas). L'atteinte du système nerveux central (syndrome de Bing-Neel) est exceptionnelle et liée à une infiltration lymphoplasmocytaire diffuse ou localisée. Elle s'accompagne de manifestations neurologiques multiples et hétérogènes (troubles de l'équilibre, atteinte des paires crâniennes, troubles cognitifs, troubles sensitifs, atteinte motrice) (50). Le syndrome de Schnitzler décrit chez certains patients se caractérise par l'association d'une urticaire chronique à de la fièvre, des douleurs osseuses et/ou articulaires. Les mécanismes physiopathologiques sont inconnus, mais l'IL-1 semble jouer un rôle crucial.

### I.6.3 Manifestations liées aux propriétés physicochimiques de l'IgM

L'IgM est une molécule pentamérique de haut poids moléculaire qui contient des carbohydrates capables de fixer les molécules d'eau. Sa sécrétion dans le sang peut entraîner une augmentation des résistances à l'écoulement du sang et de la viscosité sanguine. Le syndrome d'hyperviscosité est une complication couramment retrouvée dans la MW, qui se manifeste par des céphalées, épistaxis, troubles visuels, hémorragies rétinienne et peut parfois être la cause de troubles de la conscience, déficits moteurs ou d'une dysfonction cardiaque.

Ces signes cliniques, observés chez 15% des patients au diagnostic (51), sont présents lorsque le taux de pic IgM dépasse 30 g/L, mais une grande variabilité existe entre les individus. Le fond d'œil est un des examens utiles à sa mise en évidence. L'IgM monoclonale peut interagir avec les plaquettes et les facteurs de coagulation (facteurs II, VIII et Willebrand), à l'origine de manifestations hémorragiques. Une des complications du syndrome d'hyperviscosité est la maladie de Willebrand acquise, par clivage des multimères de facteur Willebrand par les forces de cisaillement. De plus, la précipitation de l'IgM monoclonale au froid peut être responsable d'une cryoglobulinémie de type I, symptomatique dans 5% des cas, conséquence d'une altération de la circulation sanguine au sein des petits vaisseaux, se manifestant par une vascularite systémique (phénomène de Raynaud, acrocyanoses, arthralgies, purpura), une neuropathie périphérique ou des lésions rénales. Le dépôt de l'IgM monoclonale dans différents tissus est observé chez environ 5% des patients (atteintes glomérulaires, pulmonaires, nodules cutanés, dépôts digestifs). L'amylose à chaînes légères (AL) est une complication rare (2% des patients) et de très mauvais pronostic, liée au dépôt de chaînes légères libres sous la forme de fibres amyloïdes, avec une fréquence élevée des atteintes cardiaques et des localisations pulmonaires.

#### 1.6.4 Manifestations auto-immunes

L'activité auto-anticorps de l'IgM monoclonale peut être responsable d'atteintes auto-immunes variées, principalement des neuropathies périphériques progressives (20% des cas) (52), la plus fréquente étant une neuropathie chronique, symétrique, distale, démyélinisante avec anticorps dirigés contre la glycoprotéine associée à la myéline (anticorps anti-MAG) (50% des patients). D'autres neuropathies touchant le motoneurone sont plus rares (2% des patients), multifocales, asymétriques et sont en rapport avec des anticorps anti-gangliosides. Le syndrome CANOMAD est une neuropathie ataxique chronique rare associée de façon variable à une ophtalmoplégie et à une activité agglutinines froides, en présence d'anticorps anti-gangliosides (53). L'IgM monoclonale peut également reconnaître des antigènes associés aux globules rouges et être la cause d'anémies hémolytiques auto-immunes (10 à 15% des cas). Moins de 10% des patients présentent une anémie hémolytique de type agglutinines froides, à des températures inférieures à 37°C, associée à des troubles vasomoteurs. L'IgM monoclonale peut avoir une activité facteur rhumatoïde qui présente une affinité accrue pour le fragment constant des IgG polyclonales aboutissant à la formation de complexes immuns, responsables d'une cryoglobulinémie mixte de type II. Le dépôt de ces complexes immuns dans les petits vaisseaux active le complément et peut entraîner une vascularite systémique. Enfin, l'IgM monoclonale peut être à l'origine d'une glomérulonéphrite, en raison d'une activité anti-membrane basale glomérulaire, d'un pemphigus ou d'une rétinite, par reconnaissance des déterminants antigéniques présents sur la peau ou la rétine, respectivement.



## I.7. Diagnostic biologique

### I.7.1 Critères diagnostiques

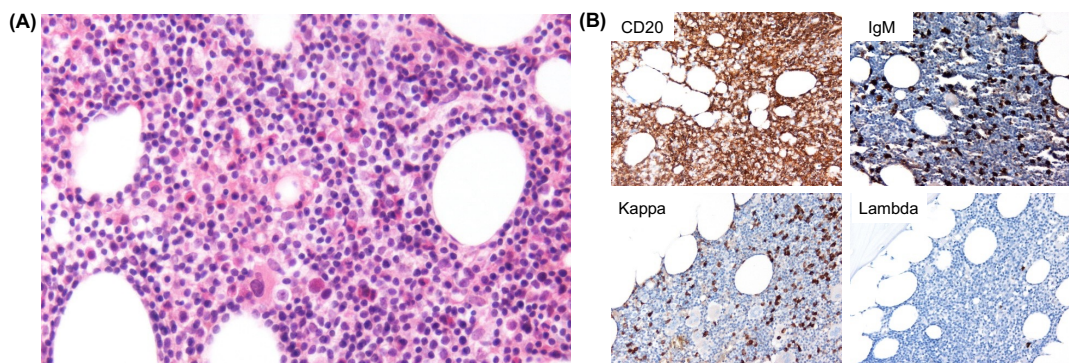
Les critères diagnostiques, adoptés lors du deuxième atelier sur la MW en 2002 (54) et réactualisés en 2016 lors du huitième atelier international (55) s'appuient sur des examens sériques et médullaires. Le diagnostic de MW est posé sur la présence d'une IgM monoclonale sérique, quelle que soit sa concentration, associée à une infiltration médullaire diffuse par des petits Ly à différenciation plasmocytaire, représentant 10% ou plus des cellules médullaires et de phénotype IgM<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD5<sup>-/+</sup>, CD10<sup>-/+</sup>, CD23<sup>-/+</sup>, CD22<sup>+</sup>, FMC7<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, CD103<sup>-</sup>, éventuellement associés à un composant plasmocytaire CD38<sup>+</sup>/CD138<sup>+</sup>. La réactualisation de 2016 a introduit la mutation *MYD88*<sup>L265P</sup> dans les critères diagnostiques.

### I.7.2 Immunochimie

L'électrophorèse des protéines sériques (EPS) révèle la présence d'une IgM monoclonale sous la forme d'un pic dans la région gamma ou bêta du protéinogramme. Elle permet de la quantifier par intégration du pic et d'en suivre l'évolution. L'immunofixation sérique identifie l'Ig monoclonale en définissant le type de chaîne lourde et de chaîne légère. La quantification des chaînes légères libres sériques est recommandée en cas de suspicion d'amylose AL, d'atteinte rénale ou dans les rares cas de détection des chaînes légères libres quand l'IgM monoclonale n'est pas quantifiable (56). Leur taux serait corrélé avec le temps de mise sous traitement (57).

### I.7.3 Examens médullaires

La réalisation d'une biopsie ostéo-médullaire (BOM) avec analyse immunohistochimique permet d'apprécier la disposition et la quantité de l'infiltrat tumoral. Elle met souvent en évidence une infiltration nodulaire, diffuse et/ou interstitielle de petits Ly mêlés en proportion variable à des lymphoplasmocytes et des plasmocytes (Figure 3).



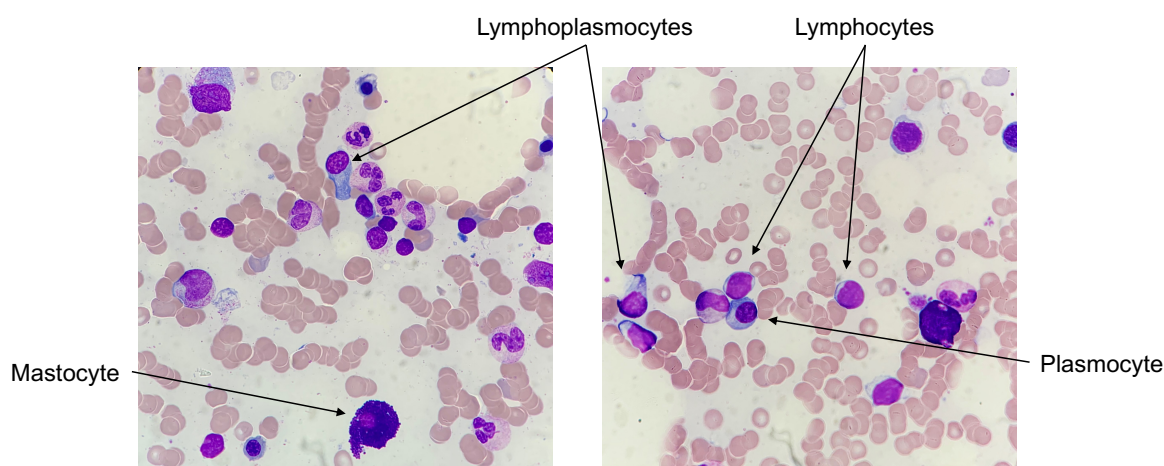
**Figure 3 : Analyse histologique d'une BOM de patient atteint de MW.**

A. Coloration hématoxyline-éosine-safran montrant un infiltrat lymphoplasmocytaire interstitiel dense.  
B. Analyse immunohistochimique indiquant une différenciation lymphoïde B (CD20<sup>+</sup>) et plasmocytaire (IgM<sup>+</sup>, kappa<sup>+</sup>) de l'infiltrat. Service d'anatomie et de cytologie pathologiques, Hôpital Pitié-Salpêtrière.

Il est fréquent d'observer la présence de mastocytes, souvent au niveau d'amas lymphoïdes, révélés par un immunomarquage de la tryptase.

Concomitante à la BOM, l'aspiration de moelle osseuse (MO) est indispensable à la démarche diagnostique et permet la réalisation des examens spécialisés de :

- **cytologie** (Figure 4) : d'appréciation plus fine que la BOM, elle met en évidence une infiltration de la moelle par des Ly de taille hétérogène, petite à moyenne, dont certains présentent une différenciation plasmocytaire (lymphoplasmocytes avec un noyau excentré), associée à des plasmocytes en proportion variable selon les patients et souvent des mastocytes, de morphologie normale, utiles au diagnostic (fréquemment retrouvés dans les grains médullaires). Des inclusions intranucléaires volumineuses (corps de Dutcher-Fahey), correspondant à des dépôts de l'IgM monoclonale, peuvent être retrouvées dans les Ly.



**Figure 4 : Cytologie médullaire d'un patient ayant une MW.**

Coloration au May Grunwald Giemsa, infiltration par un *continuum* lymphoplasmocytaire associé à des mastocytes (objectif x100). Service d'Hématologie Biologique, Pitié-Salpêtrière.

- **cytométrie en flux (CMF)** : le phénotypage révèle la présence d'une population lymphocytaire de la lignée B ayant une restriction isotypique pour une chaîne légère et exprimant des marqueurs phénotypiques permettant de la caractériser. Une analyse approfondie du phénotype des LyB tumoraux de la MW est présentée dans la partie II.
- **cytogénétique** : elle n'est pas indispensable pour l'évaluation diagnostique de la MW, les anomalies cytogénétiques n'étant pas spécifiques, mais reste cependant très utile pour le diagnostic différentiel avec les autres SLP-B.
- **biologie moléculaire** : elle permet notamment de rechercher la mutation MYD88<sup>L265P</sup>. Les études récentes ont montré un rôle essentiel des mutations de MYD88 et CXCR4 dans l'évaluation de la réponse au traitement et le pronostic des patients. L'étude des mutations de CXCR4 reste actuellement limitée aux évaluations protocolaires.

## **I.8. Prise en charge thérapeutique des patients**

### I.8.1 Indications de traitement

Selon les recommandations internationales, un traitement doit être initié uniquement chez les patients symptomatiques (56,58) devant :

- la présence de signes généraux (altération de l'état général, sueurs, fièvre),
- une activité délétère de l'IgM (syndrome d'hyperviscosité, cryoglobuline symptomatique, neuropathie périphérique sévère, amylose AL...),
- une anémie (hémoglobine <10 g/dL) et/ou une thrombopénie (plaquettes < 100 G/L),
- une masse tumorale symptomatique ou volumineuse.

L'anémie est l'indication de traitement la plus fréquente. Le taux de l'IgM n'est pas un critère thérapeutique, mais un taux élevé doit faire rechercher un syndrome d'hyperviscosité et des hémorragies rétinienne. Les patients asymptomatiques nécessitent une simple surveillance.

### I.8.2 Différentes options thérapeutiques

La MW est actuellement une maladie incurable en dehors de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, le traitement vise donc à améliorer la survie et la qualité de vie des patients.

#### *I.8.2.1. Traitements de première ligne*

L'actualisation des recommandations consensuelles de traitement a été faite lors du dixième atelier international sur la MW (59). Le choix du traitement est guidé par le profil clinique du patient (nécessité ou non d'obtenir une réponse rapide), ses caractéristiques génomiques, la disponibilité et le profil de toxicité du médicament. Longtemps utilisés dans la MW, le chlorambucil et les analogues des purines (fludarabine) sont maintenant écartés au profit de nouvelles thérapies. Les agents alkylants (cyclophosphamide, bendamustine) et les inhibiteurs du protéasome (bortézomib, carfilzomib, ixazomib), en association avec le rituximab, ou les inhibiteurs de BTK (ibrutinib), seuls ou en association avec le rituximab, sont à privilégier.

#### ➤ *Rituximab*

Anticorps monoclonal anti-CD20, le rituximab est un élément clé du traitement, les cellules de la MW exprimant cet antigène. Il est recommandé de l'associer avec d'autres molécules, les taux de réponse en monothérapie ne dépassant pas 50% pour la réponse globale (60,61). Toutefois, son utilisation seule est réservée aux patients fragiles avec des comorbidités multiples ou lorsque la symptomatologie résulte d'une activité auto-immune à IgM.

➤ Combinaisons avec le rituximab

Le traitement standard repose sur l'association rituximab/cyclophosphamide/ dexaméthasone. Bien tolérée, elle a un taux de réponse majeure (réponses partielle et complète) de 74% et de réponse globale (réponses mineure et majeure) de 83%, avec des médianes de survie sans progression (SSP) et de survie globale (SG) de 35 et 95 mois, respectivement (62). L'association rituximab/bendamustine est une autre combinaison fréquemment utilisée, notamment pour les patients ayant une forte masse tumorale et/ou peu de comorbidités, du fait d'une toxicité plus élevée. Le taux de réponse globale est compris entre 95 et 97% selon les études avec une SSP à 2 ans de 88 et 97% (63). Une autre stratégie thérapeutique repose sur un inhibiteur du protéasome, le bortézomib, en association avec le rituximab, chez les patients en situation d'urgence thérapeutique ou les plus jeunes afin d'éviter l'usage des alkylants. La combinaison rituximab/bortézomib/dexaméthasone offre une activité synergique et rapide avec un taux de réponse majeure de 68% et une SSP médiane de 43 mois (64). La survenue de neuropathies est cependant un des effets secondaires les plus fréquents (46% des cas). De nouveaux inhibiteurs du protéasome sont en cours d'évaluation. Le carfilzomib, molécule de deuxième génération, associé en première ligne de traitement au rituximab et à la dexaméthasone, présente avec un taux de réponse élevé sans toxicité importante (65).

➤ Inhibiteurs de BTK

L'ibrutinib, inhibiteur sélectif de la BTK, présente une bonne efficacité thérapeutique en première ligne avec une réponse globale de plus de 90% (66), les meilleurs réponses étant observées chez les patients *MYD88* muté et *CXCR4* non muté. Dans une étude randomisée de phase 3, les patients ayant reçu l'association rituximab/ibrutinib ont un taux de SSP à 30 mois de 82% contre 28% pour le rituximab seul, avec un délai médian de réponse estimé à deux mois (67). De nouveaux inhibiteurs plus sélectifs (acalabrutinib, zanubrutinib, tirabrutinib) sont en cours d'évaluation et présenteraient moins de toxicité, notamment cardiovasculaire.

1.8.2.2. Traitement de la rechute

Les traitements de rattrapage, pour les patients en rechute ou réfractaires, dépendent de la durée de la réponse et de la tolérance au précédent traitement, de l'état général du patient et de ses comorbidités ainsi que de l'accès aux essais cliniques en cours. Plusieurs molécules ou associations thérapeutiques, actuellement évaluées dans des essais cliniques chez des patients en rechute ou réfractaires, apparaissent comme des nouveautés thérapeutiques prometteuses, parmi lesquelles l'association obinutuzumab/idelalisib, l'ixazomib, l'oprozomib, le vénétoclax, l'ulocuplumab (inhibiteur de CXCR4) (68).

## I.9. Facteurs pronostiques

Le délai médian de progression d'une forme asymptomatique vers une forme symptomatique est d'environ sept ans. En présence d'un des critères suivants, le risque de progression à deux ans est supérieur à 60% : taux d'IgM  $\geq 45$  g/L,  $\beta 2$ -microglobuline  $\geq 4$  mg/L, infiltration médullaire  $\geq 70\%$ , taux d'albumine  $\leq 35$  g/L (69). La médiane de survie est de huit ans à partir du premier traitement. Cependant près de 40% d'entre eux survivent plus de dix ans, parmi lesquels 73% décèdent d'une autre cause (70). Les formes familiales, souvent plus graves, se caractérisent par une infiltration médullaire précoce et plus importante, avec une réponse et une SSP sous rituximab moins bonne que les formes sporadiques (71). Différents scores pronostiques ont été établis pour prédire, d'une part l'évolution vers une forme symptomatique en cas de MW indolente, et d'autre part la SSP et la SG des patients atteints de MW symptomatique. Le plus utilisé est l'index pronostique international ou ISSWM (*International Prognostic Scoring System for Waldenström Macroglobulinemia*), établi pour les patients symptomatiques (Tableau 1). Il est applicable aux patients traités par rituximab, agents alkylants et analogues des purines (72).

(A)		(B)			
	Points	Risque	Score	Médiane de SG (mois)	Taux de SG à 5 ans
Age > 65 ans	1	Faible	0 ou 1 (sans l'âge)	142,5	87%
Hémoglobine $\leq 11,5$ g/dL	1	Intermédiaire	Age ou 2	98,6	68%
Taux de plaquettes $\leq 100$ G/L	1	Elevé	$\geq 3$	43,5	36%
$\beta 2$ -microglobuline > 3 mg/L	1				
Taux d'IgM monoclonale > 70 g/L	1				

**Tableau 1 : Score ISSWM établi pour les patients symptomatiques (72).**

A. Facteurs pronostiques pris en compte dans le score. B. Stratification du risque selon le score et résultats obtenus par catégorie de risque.

Ce score a été révisé en 2019 pour mieux appréhender le pronostic des patients, devant l'utilisation de nouvelles thérapies (Tableau 2) (73).

(A)		(B)			
	Points	Risque	Score	Taux de SG à 5 ans	Taux de SG à 10 ans
Age $\leq 65$ ans	0	Très faible	0	95%	84%
Age 66-75 ans	1	Faible	1	86%	59%
Age > 75 ans	2	Intermédiaire	2	78%	37%
$\beta 2$ -microglobuline > 4 mg/L	1	Elevé	3	47%	19%
LDH > 250 UI/L	1	Très élevé	4-5	36%	9%
Albumine sérique < 35 g/L	1				

**Tableau 2 : Score ISSWM révisé pour les patients symptomatiques (73).**

A. Facteurs pronostiques pris en compte dans le score révisé et points attribués. B. Stratification du risque selon le score et résultats obtenus par catégorie de risque.

D'autres paramètres clinico-biologiques sont associés à un pronostic défavorable au diagnostic chez les patients symptomatiques (altération de l'état général, perte de poids, organomégalie, cryoglobulinémie) (74). Certaines anomalies cytogénétiques et moléculaires seraient responsables d'une progression plus rapide vers une forme symptomatique et donc liées à un mauvais pronostic, quel que soit le score ISSWM : la présence d'une del6q, d'une altération de P53 (mutation de TP53 et/ou del17p) ou d'une mutation de SPI1 (17,37,41,75).

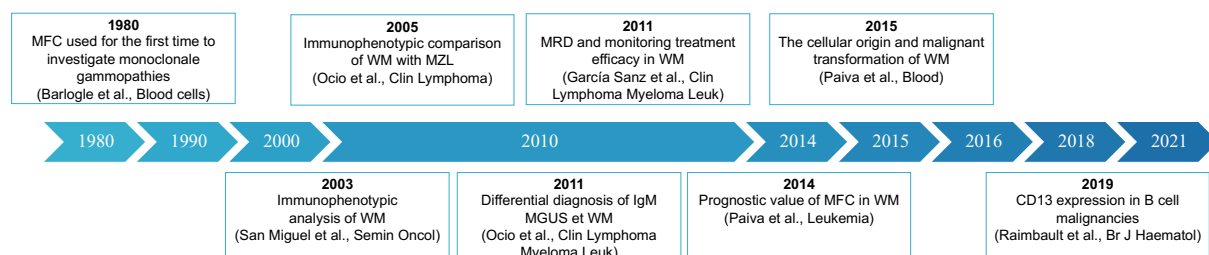
L'absence de mutation de *MYD88* est associée à une SSP et une SG inférieures, à une moindre réponse au traitement et est également liée à un risque de transformation histologique en lymphome de haut grade (76–78). L'impact pronostique des mutations de *CXCR4* sur la réponse à certains traitements est discuté selon les études. Certaines études indiquent que les mutations non-sens seraient associées à une charge tumorale plus élevée, une moins bonne réponse et SSP sous ibrutinib (34,79). L'impact pronostique des mutations de *CXCR4* n'a pas été mis en évidence pour les patients traités par immunochimiothérapie ou inhibiteurs du protéasome (63,80,81).

## II. PLACE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LA MW

### II.1. Généralités

La CMF est une technique d'analyse cellulaire multiparamétrique rapide et précise qui étudie simultanément diverses caractéristiques des cellules telles que leur morphologie (taille et structure) et l'expression de leurs antigènes membranaires et intracellulaires, grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes. En complément de l'étude cytologique, elle constitue une étape essentielle dans le diagnostic et le suivi de la majorité des hémopathies malignes, en particulier les leucémies aiguës et les SLP, dont fait partie la MW. En pleine expansion ces dernières années, elle permet une évaluation et une discrimination claire des populations cellulaires pathologiques, même lorsque celles-ci sont en faible quantité par rapport aux populations résiduelles normales.

D'après les recommandations du deuxième atelier sur la MW de 2002 (54), actualisées en 2016 (55), la présence d'une infiltration médullaire doit systématiquement être confirmée par des études immunophénotypiques sur MO et/ou immunohistochimiques sur BOM. Ces analyses permettent de caractériser la nature lymphoïde B et la monotypie des cellules tumorales et sont d'une aide précieuse dans le diagnostic différentiel des autres SLP-B. Grâce aux avancées technologiques concernant aussi bien les cytomètres que les logiciels de réanalyse (jusqu'à 17 marqueurs phénotypiques évaluables simultanément (15)), les études ont mis en avant l'utilité de la CMF dans la caractérisation de la cellule tumorale de la MW, l'aide au diagnostic différentiel des autres entités cliniques sécrétant une IgM monoclonale, le pronostic et l'évaluation de la maladie résiduelle (Figure 5).



**Figure 5 : Découvertes les plus importantes en CMF dans la MW (adapté de (82)).**

## II.2. Marqueurs phénotypiques fréquemment étudiés dans la MW

Chaque LyB est caractérisé par son BCR, constitué de deux chaînes lourdes ( $\mu$  pour la MW) et de deux chaînes légères kappa ( $\kappa$ ) ou lambda ( $\lambda$ ) reliées entre elles par des ponts disulfures. Les chaînes légères sont exprimées en surface pour les LyB et en intracellulaire pour les LyB et les plasmocytes, avec une répartition normale de 2/3  $\kappa$  et 1/3  $\lambda$ . La recherche de leur expression par CMF est indispensable car elle permet de mettre en évidence la restriction isotypique du clone dans un SLP-B.

Les marqueurs phénotypiques (cluster de différenciation ou CD) permettent ensuite de préciser le diagnostic. Ci-dessous sont présentés les antigènes d'intérêt évalués au laboratoire pour le diagnostic de la MW, avec pour chacun d'entre eux leurs expressions cellulaires et leurs propriétés physiologiques (Tableau 3) (83).

Antigène d'intérêt	Expression cellulaire	Propriétés physiologiques
<b>CD19</b>	LyB et plasmocytes	Cycle cellulaire, croissance et différenciation des LyB, coordination LyT-LyB, activateur ou répresseur selon la réponse immunologique
<b>CD5</b>	LyT et minorité de LyB	Régulation de la réponse proliférative : signal inhibiteur de la réponse issue du BCR
<b>CD10</b>	LyB et LyT immatures (centre germinatif), polynucléaires neutrophiles	Clivage des acides aminés, inactivation de certains peptides hormonaux
<b>CD13</b>	Précurseurs hématopoïétiques, polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages et plasmocytes normaux	Clivage de peptides, présentation de l'antigène, chimiotactisme, croissance et différenciation, mobilité et adhésion cellulaire, phagocytose, régulateur négatif de l'activation des mastocytes
<b>CD20</b>	LyB	Développement et différenciation des LyB
<b>CD22</b>	LyB	Inhibe les signaux induits par l'activation du BCR et CD19 après fixation de l'antigène, maintien l'équilibre de l'hématopoïèse B (activation, prolifération, apoptose)
<b>CD23</b>	LyB activés <i>Forme soluble possible (rôle de facteurs de croissance)</i>	Croissance et différenciation de la lignée lymphoïde B, régulation de la production d'IgE
<b>CD25</b>	LyB et LyT activés <i>Forme soluble possible</i>	Méiateur de la réponse immune : effet sur la croissance, le développement et l'activité des LyB, LyT et cellules NK
<b>CD27</b>	LyT activés LyT et LyB mémoires <i>Forme soluble possible</i>	Régulation de l'activation, prolifération et survie des LyT et LyB (production des Ig), rôle dans la capacité des LyB à se lier aux cellules stromales
<b>CD38</b>	Cellules centro-folliculaires, LyT immatures, LyT et LyB activés, plasmocytes	Signalisation et adhérence cellulaire
<b>CD43</b>	LyT Minorité de LyB	Régule l'adhésion cellulaire et participe à l'activation des LyT et leur migration vers le site de l'inflammation, homéostasie immunitaire
<b>CD79b</b>	Précurseurs lymphoïdes B LyB, plasmocytes	Transduction du signal provenant du BCR, transport des Ig de surface
<b>FMC7</b>	LyB matures	Glycoprotéine non clusterisée, épitope du CD20, fonctions pas clairement identifiées

**Tableau 3 : Caractéristiques physiologiques des antigènes d'intérêt évalués au laboratoire pour le diagnostic de la MW d'après (83).**

## **II.3. Profil phénotypique de la MW**

### **II.3.1 Caractérisation phénotypique des LyB tumoraux**

Dans la MW, les Ly pathologiques expriment tous l'antigène pan-leucocytaire CD45, avec une intensité de fluorescence et une expression similaire aux LyB normaux (fort et homogène).

Ils appartiennent à la lignée lymphoïde B, caractérisée par la présence des antigènes de surface pan-B CD19, CD20 et CD22. Les LyB clonaux expriment le BCR, composé de CD79a, CD79b et de l'IgM de surface. La restriction isotypique de l'IgM pour la chaîne légère  $\kappa$  ou  $\lambda$  signe le caractère pathologique de la prolifération lymphocytaire. La chaîne légère  $\kappa$  est prédominante par rapport à la chaîne légère  $\lambda$  (ratio 5:1) (15,84,85). Ils expriment plus faiblement le CD22, sans modification d'expression du CD19 et du CD20, par rapport aux LyB matures normaux. Chez certains patients, une diminution d'intensité du CD79b (5%) et du CD81 (19%) a été rapportée (15).

Les LyB clonaux sont positifs pour le CD24, HLA-DR et Bcl-2 dans une grande majorité des cas. Le FMC7, présent dans 70% des cas, est d'expression hétérogène (de négatif à fort) tandis que le CD25, lorsqu'il est présent (74 à 88% des cas), a une fluorescence homogène à la surface des LyB pathologiques (84,86). Le CD200 est positif chez environ 60% des patients (15). L'expression du CD38 à la surface des LyB pathologiques est retrouvée dans la moitié des cas de MW avec une distribution hétérogène et une expression plus faible que les cellules B progénitrices ou les plasmocytes, reflétant la nature lymphoplasmocytaire du clone (84). L'antigène CD45RA, marqueur des LyB naïfs, est systématiquement retrouvé sur les LyB clonaux, tandis que CD45RO, signature des LyB mémoires, est négatif chez pratiquement tous les patients. L'antigène de surface mémoire CD27 est présent chez la majorité des patients avec une expression hétérogène, négative à faiblement positive (84,87). L'antigène CD52, rarement étudié, est positif pour l'ensemble des patients ayant une MW (88,89).

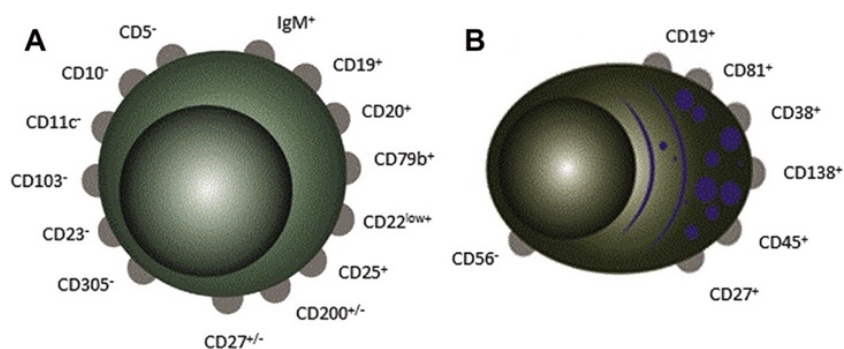
Récemment, l'étude de Raimbault et coll. met en évidence que 64% des patients ayant une MW expriment à la surface des LyB pathologiques l'antigène myéloïde CD13 avec une médiane de positivité égale à 31% (90). Le seuil de positivité de 2% permet d'avoir les meilleures performances diagnostiques en faveur d'une MW. Cette expression aberrante, retrouvée également dans d'autres SLP-B (91–93) et sur les plasmocytes normaux et pathologiques, serait liée à la différenciation plasmocytaire.

Majoritairement négatifs chez les patients ayant une MW, le CD5 et CD23 présentent toutefois des variations d'expression à la surface des LyB pathologiques. En effet, moins de 20% des patients ont une intensité faible à très forte du CD5 et 1 à 60% des patients, le plus souvent symptomatiques, expriment le CD23 avec une faible intensité (84,85,88,94–96). La co-expression CD5/CD23 est rare dans la MW.



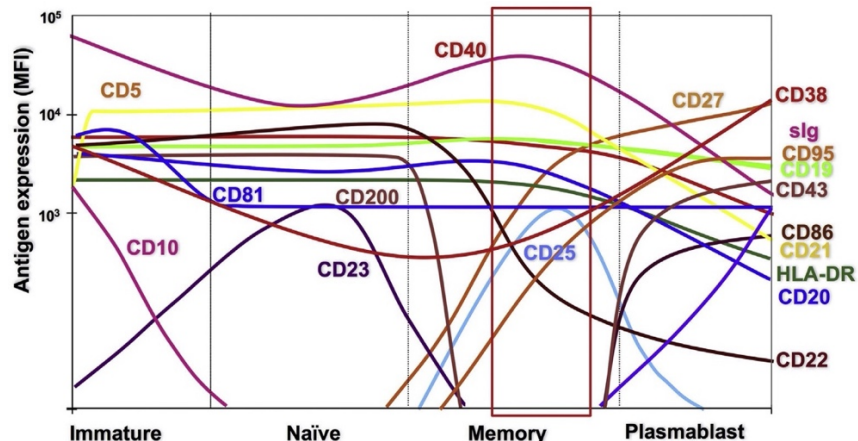
A l'inverse des patients présentant une leucémie à tricholeucocytes avec un pic IgM, les LyB de la MW sont négatifs pour le CD103. Les molécules d'adhésion telles que les  $\beta$ 2-intégrines sont rarement présentes : CD11b n'est jamais exprimé et seuls 15% des patients expriment avec une faible intensité le CD11c sur moins de 10% de LyB pathologiques (84,87). Ces résultats diffèrent de ceux observés par Konoplev et coll. qui retrouvent une expression du CD11c chez 81% des patients étudiés (88). L'expression du CD10, associée aux LyB du centre germinatif, est absente dans la majorité des cas de MW. Le CD305 est généralement négatif à la surface des LyB pathologiques (perte d'expression homogène pour 69% des cas) contrairement aux LyB normaux positifs avec une expression hétérogène (15). Le CD43, peu décrit dans la MW, est faiblement exprimé à la surface des LyB pathologiques (97).

Pour synthétiser ces données, le profil d'expression immunophénotypique couramment exprimé par les LyB pathologiques de la MW, associé à une restriction de la chaîne légère de l'IgM de surface, est décrit sur la Figure 6A. Bien qu'elle ne soit pas totalement spécifique, la combinaison CD22<sup>+faible</sup>/CD25<sup>+</sup> est fréquemment retrouvée sur le clone Waldenström (87).



**Figure 6 : Immunophénotype du clone de la MW avec le profil des LyB pathologiques (A) et des plasmocytes pathologiques (B) (82).**

Aucun marqueur pris isolément ne peut prédire ou exclure une MW. C'est l'analyse combinée de l'expression des différentes protéines qui permet d'orienter vers le diagnostic de MW. Le niveau d'expression modéré à fort des IgM de surface, associé à une diminution d'expression du CD22, correspond à un stade de LyB matures avant la différenciation en plasmocytes. D'après le profil phénotypique précédemment décrit, les cellules de la MW pourraient être issues d'une prolifération de cellules post-centre germinatif, activées suite à la rencontre avec l'antigène (10). Pour certains patients, l'expression du CD27 associée à la présence d'hypermutations somatiques suggéreraient que le clone de la MW serait issu de LyB mémoires générés à partir du centre germinatif (Figure 7). Néanmoins, certains patients n'expriment pas le CD27 et n'ont pas d'hypermutations somatiques, évoquant chez eux une origine différente des LyB pathologiques (15,84).



**Figure 7 : Profil antigénique de la différenciation lymphocytaire B dans le sang périphérique.**  
Le profil phénotypique de la MW correspondrait à l'encadré rouge (10).

### II.3.2 Caractérisation phénotypique du clone plasmocytaire et des lymphoplasmocytes

Le clone lymphocytaire B peut être associé à la présence d'un contingent de plasmocytes qui exprime en intracytoplasmique le même isotype de chaîne légère que le composant lymphocytaire B de la MW. Le taux médian de plasmocytes chez les patients est égal à 0,3%, seuls 10% présentent un taux supérieur à la normale (87). Leur profil antigénique est similaire à celui des plasmocytes normaux, moins de 10% des patients présentent des aberrations antigéniques. Ils ont une expression variable mais souvent positive pour les CD19, CD27, CD45, CD81, CD38, CD138 et négative pour le CD56 (87,98) (Figure 6B). La plupart des plasmocytes n'expriment pas le CD20, CD22 et l'IgM de surface. Il est possible d'identifier une population de plasmocytes clonaux immatures de phénotype plasmoblastique chez 40% des patients atteints de MW, avec une expression forte du CD19, CD27, CD45 et CD38 et une expression partielle du CD138, associées à une diminution progressive du CD20 (82). Les plasmocytes semblent être les principaux responsables de la production de l'IgM monoclonale sérique : plusieurs études ont montré une corrélation entre le nombre total de plasmocytes médullaires et le taux de pic IgM (87,99).

Dans la MW, les populations cellulaires pathologiques sont observées au niveau des compartiments lymphocytaire et plasmocytaire, impliquant un certain degré de différenciation du clone pathologique avec la possibilité de mettre également en évidence la population intermédiaire de lymphoplasmocytes. Détectables dans 40% des cas, les lymphoplasmocytes ont des caractéristiques phénotypiques intermédiaires, en taille et structure, avec la présence d'une restriction de chaîne légère et la coexistence de marqueurs lymphocytaires B (CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, FMC7<sup>+</sup>) et plasmocytaires (CD38<sup>+</sup> de forte intensité) (84). Récemment, il a été mis en évidence que la détection par CMF de LyB et de plasmocytes présentant la même monotypie et associés à un *continuum* d'expression du CD138 à leur surface, est fortement liée à l'augmentation du taux de pic IgM et peut rapidement orienter vers un diagnostic de MW, avec un taux de prédiction élevé pour la mutation *MYD88* (100).

### II.3.3 Hétérogénéité phénotypique

La MW est une pathologie hétérogène, tant au niveau cellulaire que clinique, ce qui peut rendre son diagnostic difficile. Certains patients présentent une hétérogénéité phénotypique intraclonale avec des variations d'expression observées pour certains marqueurs tels que le CD5, CD23 et FMC7 (84). Cette hétérogénéité n'est pas spécifique de la MW et fait l'objet de nombreuses études pour comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la pathogénèse des hémopathies (101). Elle peut être retrouvée également dans la LLC ou le MM. D'autres patients présentent la coexistence de deux clones différents (l'un  $\kappa$  et l'autre  $\lambda$ ), confirmée par des études de réarrangement des gènes d'Ig (84). De rares patients ont une MW associée à un autre SLP-B (102).

### II.4. Utilité pour le diagnostic différentiel

La MW est une entité difficile à diagnostiquer en CMF, devant l'absence de profil phénotypique spécifique. Cette technique peut néanmoins jouer un rôle essentiel pour distinguer la MW des autres diagnostics différentiels (87,103).

#### II.4.1 GMSI à IgM

Une GMSI à IgM peut être identifiée plusieurs années avant le diagnostic de MW asymptomatique et/ou symptomatique. La différence entre MW et GMSI à IgM repose sur la présence sans équivoque d'une infiltration de la MO par un LLP et l'existence de symptômes attribuables à la maladie (54). Les seuils d'infiltration utilisés pour différencier la MW de la GMSI à IgM diffèrent selon les études (104). Sur une cohorte de patients allant du stade GMSI à IgM au stade MW symptomatique, Paiva et coll. ont mis en évidence une augmentation progressive de l'infiltration médullaire par les LyB matures entre le stade GMSI à IgM (médiane égale à 2,2% des Ly), MW asymptomatique (8,7%) et MW symptomatique (12,2%), associée à un nombre plus élevé de LyB monotypiques (87). Seuls les patients MW asymptomatiques et symptomatiques ont un contingent exclusif de LyB pathologiques dans 20% et 50% des cas, respectivement. Il existe une modulation phénotypique entre la GMSI à IgM et la MW symptomatique. L'expression du CD19, CD22, CD23, FMC7 et HLA-DR est plus importante et celle de l'IgM de surface, CD25 et CD27 est diminuée au stade GMSI à IgM. Néanmoins, en 2015, grâce à une analyse multiparamétrique, cette même équipe a montré une superposition des profils phénotypiques entre ces différents stades de la maladie, indiquant un phénotype très similaire entre les cellules clonales (15). L'évolution vers la MW s'accompagne d'une augmentation du pourcentage de plasmocytes médullaires monotypiques par rapport aux plasmocytes totaux. Néanmoins, le taux de plasmocytes reste stable entre les trois stades, ce qui pourrait être une caractéristique de la MW, à la différence du MM.

## II.4.2 Principaux SLP-B sécrétants une IgM

### II.4.2.1. Introduction

L'existence d'un pic monoclonal sérique de type IgM associé à une infiltration lymphoïde B peut être observée dans d'autres SLP-B associés ou non à une différenciation plasmocytaire. Le diagnostic différentiel le plus délicat avec la MW est le LZM splénique. De façon plus ponctuelle, certains cas atypiques de LLC, lymphome folliculaire (LF) et moins communément lymphome à cellules du manteau (LCM) peuvent se rapprocher du phénotype de la cellule de MW. Associés aux autres caractéristiques clinico-biologiques, des marqueurs phénotypiques spécifiques permettent de différencier ces entités de la MW (Tableau 4).

	LLC	LCM	LF	LZM	MW
<b>CD19</b>	+	+	+ faible	+	+
<b>Ig de surface</b>	+ faible ou -	++	++	+++	+
<b>CD5</b>	+	+	-	-/+	-/+
<b>CD23</b>	+	-	-/+	-	-
<b>FMC7</b>	+ faible ou -	+	+	++	+/-
<b>CD22</b>	+ faible ou -	+	+	+	+ faible
<b>CD79b</b>	+ faible ou -	++	+	++	+
<b>CD43</b>	+ forte	+ faible/-	-	-	-
<b>CD20</b>	+ faible	+	+	++	+
<b>CD10</b>	-	-/+	+/-	-	-
<b>CD103</b>	-	-	-	-/+	-
<b>CD11c</b>	+ faible/-	-	-/+	-/+	-
<b>CD25</b>	+/-	-	-/+	-/+	+
<b>CD38</b>	-/+	+/-	+	-/+	-/+
<b>CD27</b>	+/-	-/+	+	+/-	+
<b>CD180</b>	-	-	NA	+	NA
<b>CD13</b>	-	-	-	-/+	+

**Tableau 4** : Caractéristiques phénotypiques des SLP-B dont le diagnostic différentiel avec la MW peut se poser, adapté de (105).

NA : non applicable

### II.4.2.2. Le LZM splénique

Le LZM splénique est une hémopathie difficile à distinguer de la MW, tant sur le plan clinique que phénotypique (86,106). Ces deux entités expriment les marqueurs pan-B CD19, CD20 et CD22 avec une plus forte expression chez les patients ayant un LZM splénique. Le phénotype CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup>/CD5<sup>-</sup>/CD10<sup>-</sup>/CD23<sup>-</sup>, décrit dans ces deux hémopathies, est caractéristique des cellules post-centre germinatif, suggérant que le clone Waldenström pourrait provenir de cellules B mémoires de la zone marginale.

Une étude comparative menée par Ocio et coll. en 2005 a identifié certains marqueurs discriminants à la surface des LyB pathologiques (86) :

- le **BCR** (IgM de surface et CD79b), plus fortement exprimé dans la MW avec un ratio  $\kappa:\lambda$  en faveur de la chaîne légère  $\kappa$  tandis que ce ratio était proche de 1 pour les LZM,
- le **FMC7**, positif pour 63% des patients MW avec une distribution hétérogène (diminué à positif fort) tandis qu'il était positif pour 83% des LZM avec une répartition homogène,
- le **CD25**, exprimé de manière homogène chez 88% des patients ayant une MW contre 44% des patients ayant un LZM avec une distribution hétérogène,
- le **CD11c**, positif dans 31% des cas de MW contre 74% des cas de LZM,
- le **CD103**, négatif chez les patients MW tandis que 40% des patients LZM l'exprimaient,
- le **CD10**, positif pour 18% des patients avec une MW (environ 30% des LyB pathologiques) tandis qu'il était constamment négatif dans le LZM.

De plus, l'expression du CD138 est plus fréquemment observée dans la MW que dans le LZM sur BOM (60% et 18%, respectivement) (107). Une forte expression du CD180 (108) et du CD27 (87) est rapportée dans le LZM. Le CD13 peut être présent dans ces deux entités avec une médiane d'expression supérieure chez les patients ayant une MW (90). La MW se distingue du LZM par une augmentation du nombre de mastocytes. En 2015, Paiva et coll. ont mis en évidence, grâce à une analyse multiparamétrique (17 marqueurs), une séparation des profils phénotypiques de six patients ayant un LZM splénique mutés *MYD88* avec ceux ayant un clone Waldenström, les marqueurs les plus discriminants étant l'IgM de surface et CD79b, surexprimés dans la MW et le CD305, surexprimé dans les cellules du LZM (15).

#### II.4.2.3. Le LF

Le LF se distingue de la MW par la positivité du CD10, relativement spécifique bien que certains patients ne l'expriment pas. Dans la majorité des cas, l'absence de CD5 et de CD23 permet le diagnostic différentiel avec la LLC (109).

#### II.4.2.4. La LLC

Le phénotype de la LLC est le mieux défini parmi les SLP-B. Il se caractérise par une diminution de l'intensité d'expression de la chaîne légère monotypique  $\kappa$  ou  $\lambda$ . Les antigènes CD5 et CD23 sont retrouvés de façon quasi constante à la surface des LyB pathologiques, à la différence des patients ayant une MW. Le FMC7 est souvent négatif ou faiblement exprimé, tout comme le CD79b et le CD22. Ces caractéristiques immunologiques ont permis de définir un score, décrit par Matutes en 1994 puis réévalué par Moreau en 1997, qui classe un SLP-B en LLC quand il est égal à 4 ou 5. A l'inverse, dans la MW, ce score est inférieur ou égal à 3.

A l'image du LZM, Paiva et coll. se sont intéressés à des patients mutés pour le gène *MYD88* et présentant une LLC ou un clone Waldenström. Ils ont mis en évidence des profils phénotypiques différents entre ces patients, les marqueurs les plus discriminants étant l'intensité de la chaîne légère d'Ig de surface et le CD79b, plus fortement exprimés dans la MW, tandis que le CD5 est très exprimé dans la LLC (15).

#### II.4.2.5. Le LCM

Le LCM se caractérise dans 90% des cas par une expression de l'antigène CD5 à la surface des LyB pathologiques. Contrairement à la LLC, le CD23 est habituellement négatif (110). Le score de Matutes est inférieur ou égal à 3 comme pour la MW, avec une forte expression de CD20 et CD79b. L'absence d'expression du CD200 dans le LCM permet de le différencier de la LLC, positive pour ce marqueur.

#### II.4.2.6. Le MM à IgM

Le MM à IgM est rare et ne représente que 1% des cas de MM. Le diagnostic différentiel avec la MW est facilité par des phénotypes significativement différents entre ces deux entités (111,112). Il se caractérise par la présence de lésions osseuses lytiques (rares dans la MW), d'une infiltration médullaire par plus de 10% de plasmocytes non mutés pour *MYD88* (113) et la présence d'anomalies cytogénétiques non retrouvées dans la MW.

### **II.5. Autres applications potentielles de la CMF dans la MW**

#### II.5.1 Valeur pronostique de l'immunophénotypage

Associée à la cytologie, l'immunophénotypage médullaire permet d'estimer la charge tumorale et de préciser l'importance de la restriction isotypique avec le ratio des LyB pathologiques sur les LyB résiduels. Une étude rétrospective a mis en évidence que les patients ayant une MW asymptomatique, associée à une infiltration médullaire déterminée par CMF supérieure à 10%, présentaient un risque plus élevé de progression vers une MW symptomatique. A l'inverse, ceux ayant une MW symptomatique avec une infiltration médullaire inférieure à 10% et la persistance de LyB normaux résiduels, avaient une maladie moins agressive et une SG prolongée (87). Les auteurs concluent que l'équilibre entre LyB pathologiques et LyB résiduels serait un paramètre aussi efficace que l'estimation de la charge tumorale pour évaluer le pronostic des patients.

## II.5.2 Suivi de la maladie résiduelle

L'évaluation de la réponse dans la MW repose, entre autres, sur le suivi du taux d'IgM monoclonale sérique. Une évaluation médullaire n'est pas systématiquement recommandée sauf pour évaluer la rémission complète. Les évaluations médullaires sont conseillées pour les patients inclus dans des essais cliniques (114). En effet, des discordances ont été observées entre la cinétique du taux d'IgM et l'infiltration médullaire, selon les traitements administrés, certaines thérapies ciblant uniquement les LyB pathologiques sans dépléter le contingent plasmocytaire. De plus, García-Sanz et coll. ont montré que la présence de plus de 5% de LyB pathologiques dans la MO après traitement est hautement prédictif d'une courte SSP et SG, indépendamment de la réponse hématologique (115). L'évaluation par CMF des LyB pathologiques pourrait être une technique prédictive pour la survie plus sensible que les déterminants sériques, mais elle nécessite un prélèvement médullaire.

### **OBJECTIFS DE L'ETUDE**

Cette étude, réalisée au sein de l'Unité Fonctionnelle Phénotypage des Hémopathies du service d'Hématologie biologique de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, avait pour principaux objectifs :

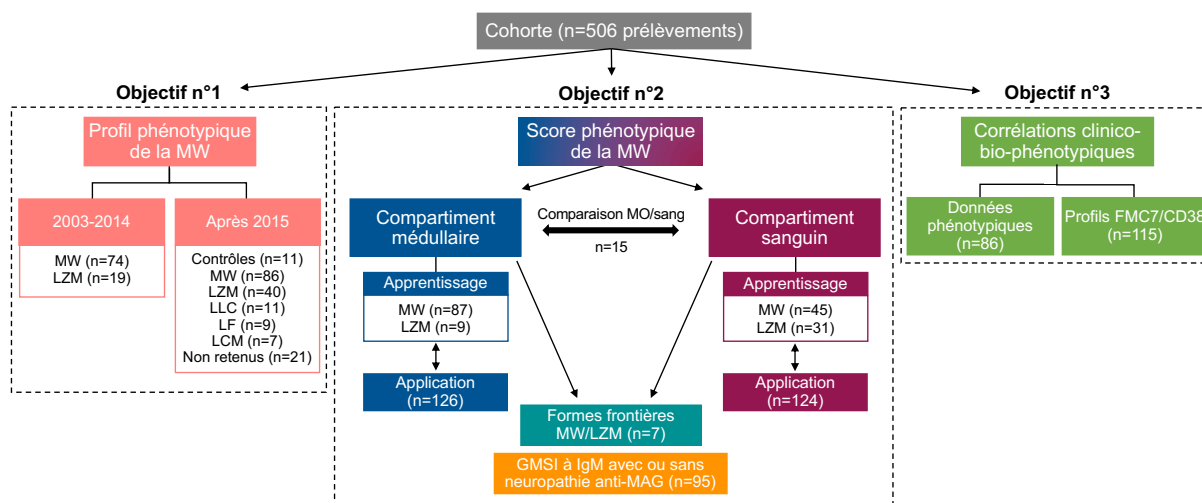
- 1) de déterminer les marqueurs phénotypiques spécifiques de la MW, en comparaison avec des sujets contrôles et d'autres SLP-B, notamment le LZM.
- 2) d'établir un score phénotypique (médullaire et sanguin) de la MW pour la différencier du LZM et pour améliorer la détection des clones circulants de MW.
- 3) de corrélérer les données phénotypiques des patients atteints de MW avec les autres paramètres clinico-biologiques.

## PATIENTS ET METHODES

### I. DESCRIPTION DES COHORTES

#### I.1. Présentation générale

Cette étude rétrospective monocentrique concerne 450 patients prélevés pour un immunophénotypage médullaire et/ou sanguin entre 2003 et 2021. Le ratio hommes/femmes était de 1,6 et la médiane d'âge au moment de la réalisation de l'immunophénotypage égale à 67 ans (18-96 ans). Au total, 506 échantillons analysés ont été recueillis soit 233 immunophénotypages médullaires et 273 immunophénotypages sanguins, répartis en trois groupes d'étude selon les objectifs (Figure 8). Les données d'un même patient / échantillon ont pu être utilisées pour répondre à différents objectifs. Pour chaque SLP-B, le diagnostic a été posé en tenant compte de l'ensemble des paramètres clinico-biologiques, selon les critères de l'OMS. Tout diagnostic de MW a été confirmé en s'assurant de la présence d'une infiltration médullaire pathologique en cytologie, selon les critères diagnostiques définis en 2002 (116).



**Figure 8** : Répartition des immunophénotypages des patients selon les objectifs de l'étude.

#### I.2. Cohortes pour le profil phénotypique de la MW

Dans un premier temps, nous avons récupéré les résultats des immunophénotypages de 216 patients ayant une MW, prélevés entre 2003 et 2014. Pour avoir une vue d'ensemble du profil d'expression des marqueurs à la surface des LyB pathologiques, nous avons sélectionné 74 prélèvements (51 MO et 23 échantillons sanguins) présentant une population lymphocytaire B CD19<sup>+</sup> avec une restriction isotypique supérieure ou égale à 90% pour une chaîne légère  $\kappa$  ou  $\lambda$ . En cas de prélèvements médullaire et sanguin pour un même patient, nous avons conservé les résultats du prélèvement médullaire. Dix-neuf patients ayant un LZM diagnostiqué avant 2015 ont été réanalysés pour étudier l'expression du CD25.



Dans un deuxième temps, nous avons constitué une cohorte de réanalyse pour évaluer les marqueurs utilisés au laboratoire entre 2015 et 2021 dans le diagnostic de la MW (Tableau 5). Les immunophénotypages médullaires de 86 patients ayant un clone Waldenström facilement identifiable ont été réanalysés et comparés à ceux d'un groupe de contrôles et d'autres SLP-B, ayant eu le même phénotypage extensif, pour lesquels un doute sur le diagnostic avec une MW se posait. Les individus contrôles présentaient un immunophénotypage normal et leur dossier clinique ne rapportait ni gammopathie ni pathologie hématologique.

	<b>Contrôles (n=11)</b>	<b>MW (n=86)</b>	<b>LZM (n=40)</b>	<b>LLC (n=11)</b>	<b>LF (n=9)</b>	<b>LCM (n=7)</b>
Ratio hommes / femmes	6/5	51/35	24/16	9/2	5/4	3/4
Age (années), médiane (minimum-maximum)	57 (18-74)	68 (28-88)	70 (50-87)	64 (25-88)	59 (45-93)	77 (48-96)
<b>Immunochimie</b>						
IgM, n	0	86	15	2	2	1
IgG, n	0	0	8	2	0	1
Absence de pic, n	8	0	14	4	4	3
Non réalisée, n	3	0	3	3	3	2
<b>Type de prélèvement</b>						
MO, n	2	86	6	3	0	2
Sang, n	9	0	34	8	9	5

**Tableau 5 : Présentation des groupes étudiés pour déterminer le phénotype de la MW.**

### **I.3. Cohortes pour le score phénotypique médullaire et sanguin**

Nous avons établi un score phénotypique pour aider au diagnostic de la MW, adapté aux compartiments médullaire et sanguin. Après reprise de chaque immunophénotypage, les performances du score phénotypique médullaire et sanguin ont été évaluées sur une cohorte d'apprentissage, pour laquelle toutes les données phénotypiques étaient disponibles. Le seuil décisionnel a ensuite été mis en application sur ces mêmes patients et des patients nouvellement diagnostiqués. Nous avons également étudié les marqueurs phénotypiques présents à la surface des LyB pour 15 patients atteints de MW et ayant un prélèvement médullaire et sanguin pathologique rapproché (délai médian de 8 jours), afin d'évaluer les éventuelles modulations phénotypiques entre la MO et le sang. Le score phénotypique a ensuite été appliqué à sept patients ayant une forme frontière entre une MW et un LZM ainsi qu'à une cohorte de GMSI à IgM associée (n=23) ou non (n=72) à une neuropathies anti-MAG.

### **I.4. Cohortes pour les corrélations clinico-bio-phénotypiques**

En collaboration avec le Service d'Hématologie clinique de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, nous disposons des données cliniques et biologiques de 270 patients atteints d'une MW, recueillies rétrospectivement. Ces données ont été corrélées avec les résultats des réanalyses phénotypiques ainsi qu'à l'expression du CD38 sur le profil FMC7/CD38, retrouvé pour 137 patients prélevés entre 2009 et 2020.

Les critères évalués étaient la présence ou non d'un syndrome d'hyperviscosité, d'un syndrome ganglionnaire, d'une splénomégalie, d'une population tumorale circulante et son pourcentage déterminé par CMF, d'anomalies cytogénétiques (del6q, trisomie 3q, trisomie 4, trisomie 12, trisomie 18, del13q, del11q, del17p et la présence d'un caryotype complexe), des mutations MYD88<sup>L265P</sup> et CXCR4<sup>S338X</sup>, ainsi que les taux d'hémoglobine, de plaquettes, de Ly sur la numération formule sanguine (NFS), le taux du pic IgM, de β2-microglobuline, d'albumine, de LDH, le score ISSWM, la date du diagnostic, l'instauration ou non d'un traitement, le délai entre le diagnostic et la mise sous traitement, la date des dernières nouvelles ou celle du décès et la date de progression de la maladie. Un séquençage à haut débit de type *next generation sequencing* (NGS) a été fait pour 163 patients, ciblé sur 21 gènes connus pour être mutés dans la MW et/ou d'autres SLP-B : *CARD11, CD79A, CD79B, MYD88, TP53, CXCR4, SPI1, TNFAIP3, PRDM1, EZH2, MLL2, ARID1A, IKZF3, NOTCH2, KLF2, NFKBIE, HIST1H1E, CREBBP, TBL1XR1, ETV6 et IRF4*. Certaines données biologiques des patients non inclus dans cette base clinique et celles des autres SLP-B ont été récupérées.

## II. ANALYSES PAR CYTOMETRIE EN FLUX

### II.1. Anticorps utilisés au laboratoire

Entre 2003 et septembre 2015, pour toute recherche de MW sur MO ou sang, les anticorps utilisés ciblaient les antigènes de surface CD19, CD20, κ, λ, CD79b, CD5, CD23, FMC7, CD38, CD10, CD43, CD25, CD11c et CD103. Les anticorps anti-CD27, anti-IgM et anti-IgD ont été utilisés entre 2001 et fin 2009, l'anticorps anti-CD22 jusque fin 2009 puis réintroduit en 2014 et l'anticorps anti-CD1c entre 2005 et 2008.

A partir de septembre 2015, un panel de cinq tubes a été construit pour toute demande d'exploration d'un pic monoclonal à IgM, pour rechercher une MW ou un diagnostic différentiel avec une MW devant une cytologie douteuse (Tableaux 6 et 7).

	FITC	PE	PC5.5	PE-Cy7	APC	APC-AF750	PB / BV421	HV500
<b>Tube 1</b>	T-	T-	T-	T-	CD34*	T-	T-	CD45
<b>Tube 2</b>	CD3/CD16+56		CD19	CD4	CD8			CD45
<b>Tube 3</b>	κ/λ		CD19	CD5	CD79b	CD10*	CD20 (PB)	CD45
<b>Tube 4</b>	FMC7	CD3 8	CD19	CD5	CD23	CD43	CD25 (PB/BV421#)	CD45
<b>Tube 5</b>	κ/λ		CD19	CD13	CD22		CD27 (BV421)	CD45

**Tableau 6 : Combinaisons des anticorps utilisés pour le dépistage d'une MW.**

En ligne sont présentés les tubes d'analyse avec les différents anticorps testés. En colonne sont présentés les fluorochromes utilisés pour chaque anticorps. T- : témoin ; FITC : Isothiocyanate de fluorescéine ; PE : R Phycoérythrine ; PC5.5 : R Phycoérythrine-Cyanine 5.5 ; PE-Cy7 : PE-Cyanine7 ; APC : Allophycocyanine ; APC-AF750 : Allophycocyanine-Alexa Fluor 750 ; PB : Pacific Blue ; BV421 : Brilliant Violet 421 ; HV500 : Horizon V500. \*anticorps étudié uniquement sur la MO. #fluorochrome utilisé à partir de janvier 2021.

Antigène/ Fluorochrome	Fabriquant Référence (REF)	Clone Isotype	Marquage ( $\mu$ L)
CD3/FITC + CD16- CD56/PE	BD Biosciences REF 342403	SK7, B73.1, MY31 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$	10
CD4/PE-Cy7	Beckman Coulter REF 737660	SFC112T4D11 Anticorps de souris anti-humain IgG1	2
CD5/PE-Cy7	BD Biosciences REF 348810	L17F12 Anticorps de souris anti-humain IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$	5
CD8/APC	BD Biosciences REF 345775	SK1 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$	5
CD10/APC-AF750	Beckman Coulter REF A89310	Clone ALB1 Anticorps de souris anti-humain IgG1	5
CD13/PE-Cy7	BD Biosciences REF 338439	L138 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$	5
CD19/PC5.5	Beckman Coulter REF B49211	J3-119 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$	5
CD20/PB	Beckman Coulter REF B49208	B9E9 (HRC20) Anticorps de souris anti-humain IgG <sub>2a</sub>	5
CD22/APC	BD Biosciences REF 333145	S-HCL-1 Anticorps de souris anti-humain IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$	5
CD23/APC	BD Biosciences REF 335036	EBVCS-5 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$	5
CD25/BV421	BD Biosciences REF 564033	2A3 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$	5
CD27/ BV421	BD Biosciences REF 562513	M-T271 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$	5
CD34/APC	BD Biosciences REF 345804	8G12 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$	5
CD38/PE	BD Biosciences REF 345806	HB7 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$	10
CD43/APC-AF750	Beckman Coulter REF B49195	DFT1 Anticorps de souris anti-humain IgG <sub>1</sub>	5
CD45/HV500	BD Biosciences REF 560777	HI30 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$	2
CD79b/APC	BD Biosciences REF 335834	SN8 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$	5
$\kappa$ /FITC + $\lambda$ /PE	Dako REF FR481	Mélange polyclonal Anticorps de lapin anti-humain	5
FMC7/FITC	Beckman Coulter REF A07791	Anticorps de souris anti-humain IgM	10

**Tableau 7 : Caractéristiques des anticorps utilisés pour le dépistage d'une MW.**

BD : Beckton Dickinson

Nous avons étudié en prospectif la réactivité de cinq anticorps anti-CD25 couplés à des fluorochromes différents pour six patients ayant une MW (Tableau 8). Les anticorps anti-CD25 ont été évalués en présence des anticorps anti-CD45, -CD19, - $\kappa$  et - $\lambda$ .

Antigène/Fluorochrome	Fabriquant Référence	Clone Isotype
CD25/PB	Beckman Coulter REF A82944	B1.49.9 Anticorps de souris anti-humain IgG <sub>2a</sub>
CD25/APC	BD Biosciences REF 340907	2A3 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$
CD25/PE-Cy7	BD Biosciences REF 335824	2A3 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$
CD25/PC5.5	Beckman Coulter REF B92458	B1.49.9 Anticorps de souris anti-humain IgG <sub>2a</sub>
CD25/BV421	BD Biosciences REF 564033	2A3 Anticorps de souris anti-humain IgG1, $\kappa$

**Tableau 8 : Caractéristiques des anticorps anti-CD25 étudiés.**

## **II.2. Stratégie d'analyse des LyB pathologiques**

En cas d'indication sur la demande d'immunophénotypage d'une cryoglobuline ou d'agglutinines froides, le prélèvement médullaire ou sanguin a été incubé à 37°C pendant une heure avant de réaliser le protocole de marquage.

L'acquisition des données a été faite par deux cytomètres de flux FACSCanto™ II (huit couleurs) de la société BD Biosciences, utilisés quotidiennement au laboratoire.

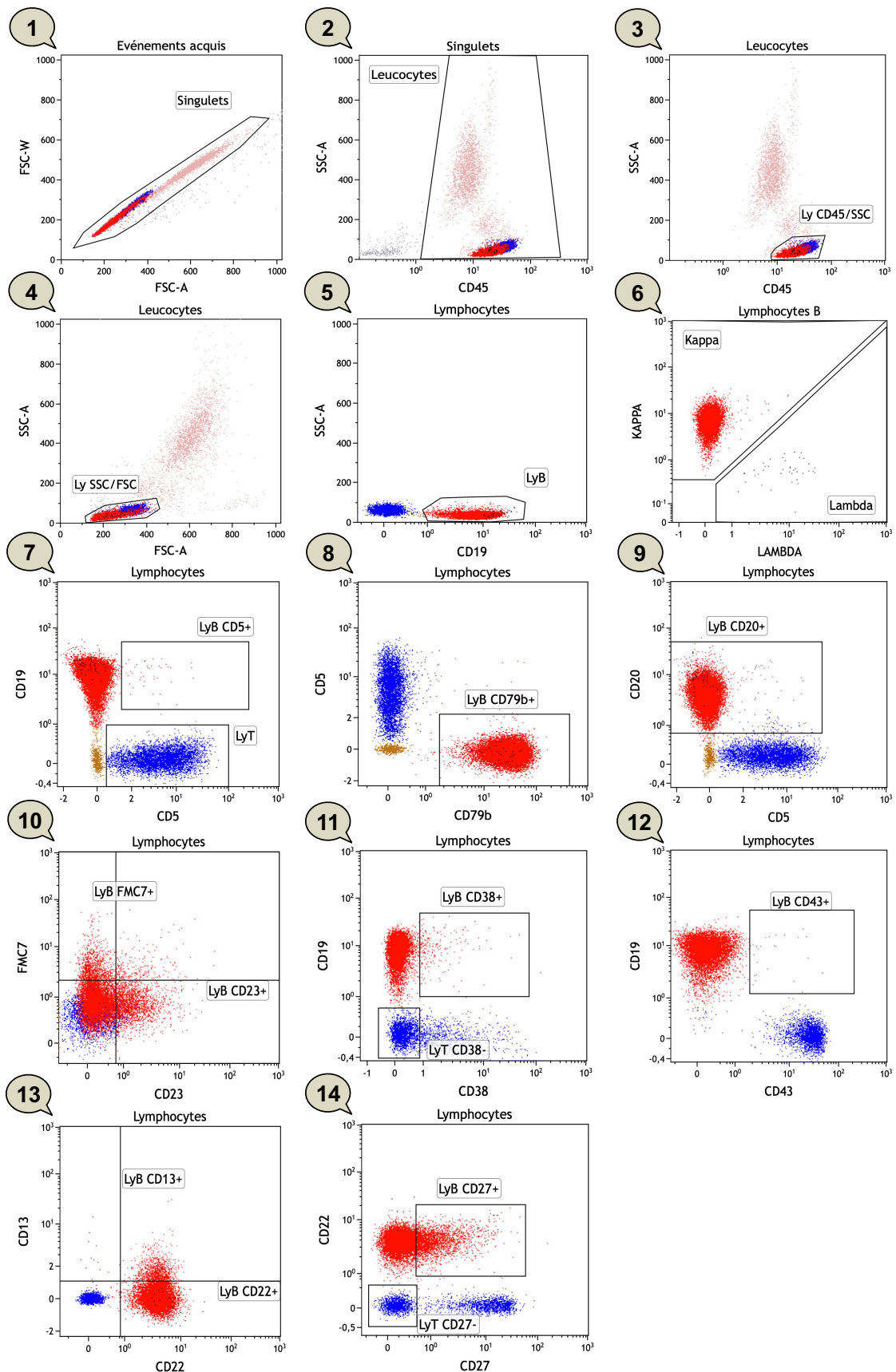
### **II.2.1 Stratégie de fenêtrage**

En routine, la réanalyse des données de CMF est faite sur le logiciel FACSDiva™ (BD Biosciences). Les immunophénotypages des patients étudiés au cours de ce travail ont tous été réanalysés avec le logiciel d'analyse Kaluza version 2.1 (Beckman Coulter) par un seul opérateur pour assurer la reproductibilité des données.

La stratégie de fenêtrage détaillée ci-dessous rassemble les représentations bi-paramétriques d'intérêt (Figure 9), sélectionnées sur les masques d'analyse créés pour chaque tube (tubes 3 à 5). Après sélection des singulets sur le graphique FSC-W/FSC-A (1), les débris cellulaires sont éliminés sur la représentation SSC-A/CD45 pour isoler uniquement les leucocytes (2). Les Ly sont isolés dans les leucocytes grâce à une équation booléenne en fonction de leur petite structure et forte expression du CD45 (Ly CD45/SSC) (3) et de leur petite taille (Ly SSC/FSC) (4). Au sein des Ly, les LyB sont isolés des LyT par leur expression du CD19 en fonction de leur structure SSC-A (5). Cette stratégie d'isolement des LyB a été appliquée à chacun des trois tubes.

Chaque tube se différencie ensuite par les anticorps utilisés pour caractériser la population lymphocytaire B pathologique :

- Les représentations bi-paramétriques 6 à 9 concernent le tube 3. La présence d'une restriction isotypique est appréciée par la répartition des chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$  à la surface des LyB (6). Les expressions de CD5 (7), CD79b (8) et CD20 (9) sont évaluées. Le CD5 permet également d'isoler les LyT qui l'expriment physiologiquement (7).
- Les représentations bi-paramétriques 7, 10, 11 et 12 concernent le tube 4. Le graphique CD19/CD5 (7) permet d'isoler les LyT. Les chaînes légères ne sont pas recherchées dans ce tube qui étudie l'expression de FMC7, CD23 (10), CD38 (11) et CD43 (12).
- Les représentations bi-paramétriques 6, 13 et 14 concernent le tube 5. La présence d'une restriction isotypique est de nouveau appréciée par la répartition des chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$  à la surface des LyB (6). Les profils d'expression du CD13, CD22 (13) et CD27 (14) sont évalués.



**Figure 9 : Stratégie d'analyse des LyB par des représentations bi-paramétriques.**

Les leucocytes sont colorés en rose, les LyB pathologiques en rouge, les LyB résiduels en noir, les LyT en bleu et les cellules *natural killer* (NK) en marron. Les antigènes de surface ciblés par les anticorps couplés à leur fluorochrome sont mentionnés en abscisse et en ordonnée des représentations bi-paramétriques. En haut de chaque fenêtre d'analyse est indiquée la population d'étude.

FSC-W : Forward Scatter-Width ; FSC-A : Forward Scatter-Area ; SSC-A : Side Scatter-Area.

## II.2.2 Interprétation des pourcentages et intensités de fluorescence

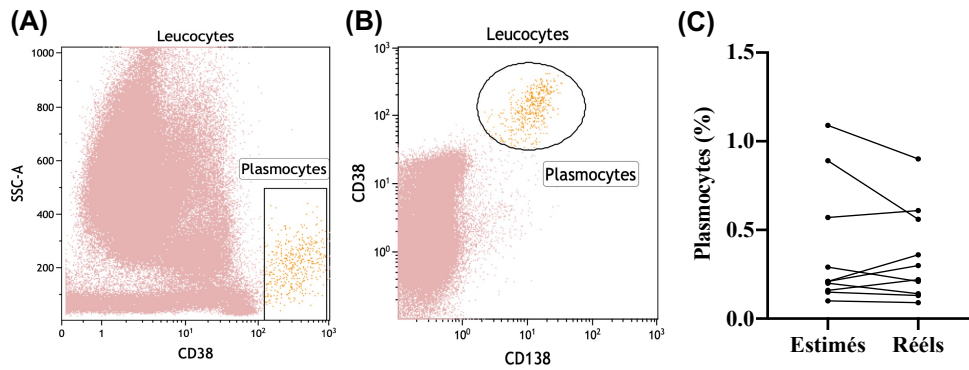
Cette réanalyse nous a permis d'obtenir le pourcentage de leucocytes, de LyT, de LyB pathologiques et de LyB polytypiques normaux (groupe contrôle) ou résiduels, quand ils étaient en nombre suffisant, ainsi que les pourcentages d'expression de chaque marqueur sur les LyB pathologiques. Une population a été considérée comme positive pour un antigène donné quand au moins 30% des cellules d'intérêt exprimaient cet antigène de surface, hormis pour le CD13 où le seuil a été fixé à 2%.

Nous avons également récupéré les intensités moyennes de fluorescence (MFI) de chaque antigène exprimé à la surface des LyT, LyB pathologiques et LyB polytypiques normaux (groupe contrôle) ou résiduels. Les échantillons étant analysés sur un logiciel d'une autre société que nos cytomètres, les valeurs de fluorescence obtenues ont été multipliées par le facteur de correction 256 (117).

Pour minimiser la variabilité entre les échantillons, nous avons fait des ratios d'intensité de fluorescence (RFI) entre les MFI des LyB et les MFI des LyT. Une partie des LyT exprimant le CD38 et le CD27, nous avons isolé les LyT CD38<sup>-</sup> et les LyT CD27<sup>-</sup> pour le calcul des RFI. Pour la partie profil phénotypique de la MW (objectif n°1), seuls les MFI et RFI des patients positifs pour le marqueur donné sont présentés. Pour l'étude de l'expression du CD27, nous avons choisi de représenter la MFI des LyB CD27<sup>+</sup> mémoires pour le groupe contrôle, quel que soit le pourcentage de LyB mémoires. La comparaison des MFI et des RFI ayant révélé des résultats similaires, nous avons uniquement présenté les statistiques des MFI.

## II.2.3 Estimation du pourcentage de plasmocytes

Nous avons estimé le pourcentage de plasmocytes médullaires et sanguins sur l'expression forte du CD38 avec la représentation bi-paramétrique SSC-A/CD38 du tube 4 (Figure 10A). Afin de s'assurer du fenêtrage correct des plasmocytes, cette approche a été comparée à un tube adapté à la recherche de plasmocytes contenant du CD38 et du CD138 (Figure 10B). Devant l'absence de différence significative entre ces deux approches, sur dix patients ayant une MW (Figure 10C), l'estimation du pourcentage de plasmocytes a pu être effectuée sur le tube 4 dans cette étude.



**Figure 10 : Estimation du pourcentage de plasmocytes.**

A. Représentation bi-paramétrique SSC/CD38 sur les leucocytes (rose) obtenue à partir du tube 4 pour estimer le pourcentage de plasmocytes, colorés en orange. B. Représentation bi-paramétrique CD38/CD138 sur les leucocytes (rose) obtenue à partir du tube adapté à la recherche des plasmocytes pour déterminer le pourcentage réel de plasmocytes, colorés en orange. C. Comparaison entre les pourcentages estimés et les pourcentages réels de plasmocytes obtenus pour dix patients atteints d'une MW.

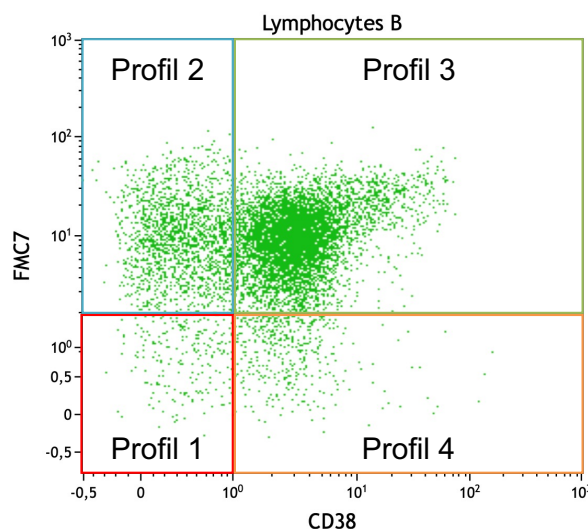
#### II.2.4 Définition d'un profil FMC7/CD38

Neufs profils FMC7/CD38 ont été définis sur une représentation bi-paramétrique FMC7/CD38 selon l'expression de ces marqueurs à la surface des LyB (Figure 11).

Les quatre premiers profils sont les :

- **Profil 1** (quadrant en bas à gauche) :  $\geq 70\%$  de LyB FMC7<sup>-</sup>/CD38<sup>-</sup>
- **Profil 2** (quadrant en haut à gauche) :  $\geq 70\%$  de LyB FMC7<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>
- **Profil 3** (quadrant en haut à droite) :  $\geq 70\%$  de LyB FMC7<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>
- **Profil 4** (quadrant en bas à droite) :  $\geq 70\%$  de LyB FMC7<sup>-</sup>/CD38<sup>+</sup>

Quand la répartition des LyB ne rentrait pas dans ces critères, nous avons regroupé par deux les profils précédents pour définir les **profils 1-2, 2-3, 3-4** et **1-4** en respectant deux conditions : (i) au moins un des deux quadrants concernés possède plus de 50% de LyB, (ii) le profil choisi correspond aux deux quadrants ayant les pourcentages les plus élevés de LyB. Si aucun critère n'était rempli, le patient présentait un **profil hétérogène**.



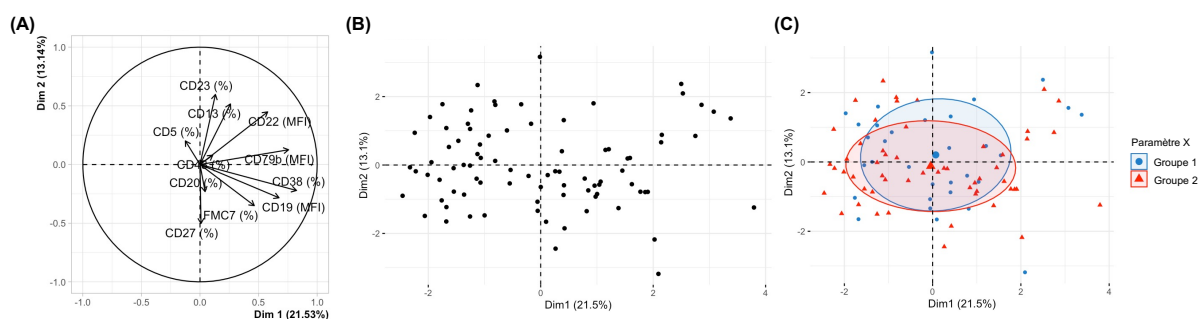
**Figure 11 : Représentation bi-paramétrique FMC7/CD38 sur les LyB normaux.**

### III. ANALYSES DES DONNEES

#### III.1. Analyses non supervisées

Les données phénotypiques de 56 patients ayant une MW et 34 patients ayant un LZM ont été intégrées dans le logiciel d'analyse non supervisée Omiq. L'homogénéité maximale entre les patients a été obtenue en sélectionnant un nombre identique de LyB. Les données phénotypiques sont représentées grâce à une méthode de réduction dimensionnelle des données avec l'algorithme *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding* (t-SNE). Il consiste à déterminer la place de chaque cellule sur une représentation en deux dimensions comprenant les axes t-SNE1 et t-SNE2, selon les anticorps présents dans le tube d'analyse. Pour chaque tube (3 à 5), nous obtenons une empreinte correspondant à un nuage de points en plusieurs îlots, chaque point étant une cellule. L'algorithme de clustering FlowSOM a ensuite été utilisé pour réaliser un fenêtrage automatique des populations cellulaires, sur les mêmes paramètres que ceux utilisés pour le t-SNE.

Des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées avec les packages FactoMineR, factoextra et ggplot2 du logiciel R version 4.0.3. Cette méthode de réduction de dimension a été appliquée sur les résultats de réanalyse de CMF selon les antigènes de surface sélectionnés (variables). Elle a permis d'identifier les marqueurs phénotypiques les plus importants. Nous avons pu obtenir un graphique de corrélation des variables étudiées, chacune définie par un vecteur, selon les dimensions 1 et 2 de l'ACP qui expliquent le mieux la variabilité (Figure 12A). La contribution relative de chaque variable est indiquée par la longueur et la direction du vecteur. Un nuage de points représentant l'ensemble des patients étudiés est généré, la position du point tenant compte des différentes variables intégrées dans l'ACP (Figure 12B). De plus, différents paramètres clinico-biologiques ont pu être appliqués sur ce nuage de patients pour mettre en évidence d'éventuelles séparations des ellipses de concentration qui contiennent 50% des individus (Figure 12C).



**Figure 12** : Exemple d'ACP des données phénotypiques du groupe de patients ayant une MW.

A. Graphique de corrélation des variables.

B. Répartition des patients représentés par un point sur l'ACP

C. Evaluation d'un paramètre X selon deux groupes symbolisés et colorés différemment. Le centre de gravité de chaque groupe est représenté par un symbole de taille plus grande que les symboles du groupe.



Nous avons également appliqué l'algorithme des forêts aléatoires (*Random Forest*) sur les données phénotypiques des patients atteints d'une MW ou d'un LZM, avec le package *randomForest* du logiciel R. Ce modèle de classification a fait un apprentissage des résultats phénotypiques de patients sur de nombreux arbres de décision construits aléatoirement, pour prédire le diagnostic de MW ou de LZM. L'indice de Gini fourni par le modèle a mesuré l'erreur de prédiction dans le processus de construction des arbres.

### **III.2. Analyses statistiques**

Les statistiques ont été réalisées avec les logiciels GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA, version 9.0.0) et STATA (STATA Corporation, College Station, TX, USA, version 14.0). Les tests effectués en analyse univariée étaient des tests bilatéraux utilisant un risque alpha conventionnel égal à 5%. Le test statistique non paramétrique de Mann-Whitney a permis de comparer les données quantitatives deux à deux entre deux groupes de diagnostics différents ou au sein d'une même variable à deux conditions. Les analyses multivariées ont été faites par régression logistique. Les performances des scores (médullaire et sanguin) ont été déterminées au moyen de courbes ROC (*Receiver Operating Characteristic*) non paramétriques, avec l'aire sous la courbe (ASC), la sensibilité (Se), la spécificité (Sp), la valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN). Le seuil optimal décisionnel a été choisi par le maximum de l'index de Youden (défini comme : sensibilité + spécificité - 1). Les diagrammes de Bland-Altman ont permis de comparer les résultats phénotypiques de 15 patients atteints de MW et ayant un prélèvement médullaire et sanguin pathologique rapproché, pour évaluer l'éventuel biais entre ces deux types de prélèvement. Les corrélations entre les données quantitatives ont été évaluées par le test non paramétrique de Spearman. Le test d'indépendance du Chi<sup>2</sup> a été utilisé pour évaluer des données qualitatives (pour les groupes ayant un effectif supérieur ou égal à 5). L'intérêt pronostique des marqueurs phénotypiques a été analysé par le log rank-test.

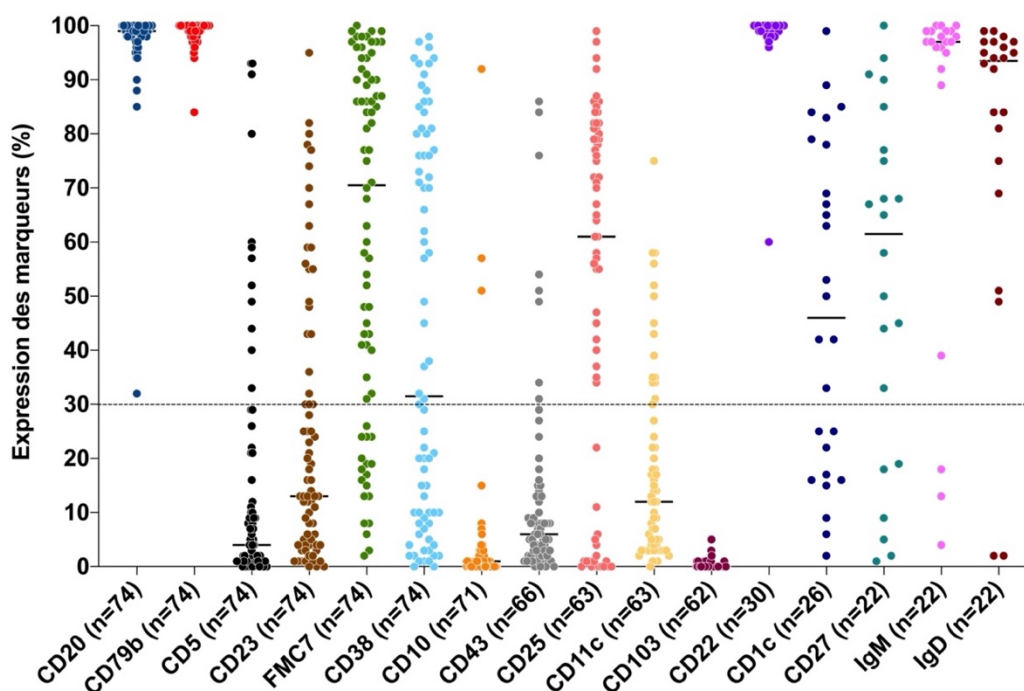
Pour l'ensemble des tests statistiques, une valeur de p inférieure à 0,05 est considérée comme statistiquement significative et symbolisée dans les figures par : \* = p<0,05 ; \*\* = p<0,01 ; \*\*\* = p<0,001 ; \*\*\*\* = p<0,0001.

## RESULTATS

### I. PHENOTYPE DES LYMPHOCYTES B PATHOLOGIQUES DANS LA MW

#### I.1. Vue d'ensemble des marqueurs étudiés avant 2015

Le premier objectif de cette étude était de déterminer les marqueurs phénotypiques spécifiques de la MW. Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux résultats de l'immunophénotypage de 74 patients diagnostiqués pour une MW entre 2003 et 2014. La Figure 13 présente l'ensemble des antigènes étudiés à la surface des LyB pathologiques.



**Figure 13** : Expression de seize marqueurs phénotypiques à la surface des LyB CD19<sup>+</sup>.

La médiane est symbolisée par un trait noir plein pour chaque marqueur. Le trait noir en pointillé représente le seuil de 30% au-delà duquel un patient est considéré comme positif pour un marqueur donné.

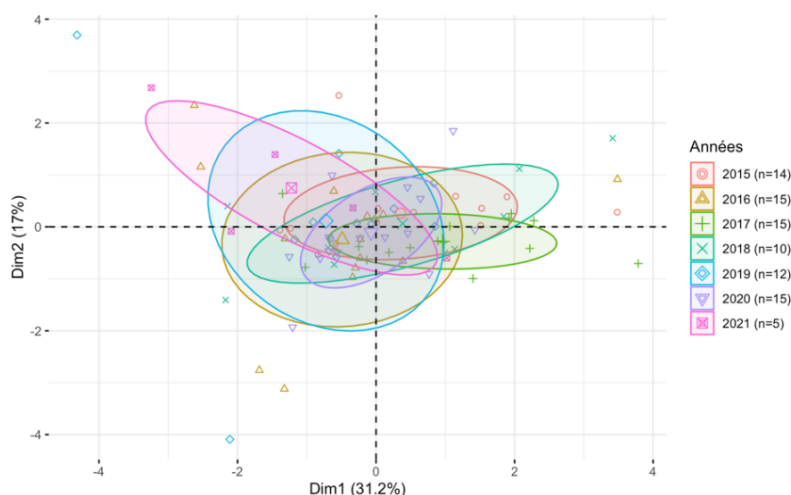
La proportion de LyB CD19<sup>+</sup> pathologiques parmi les Ly totaux est plus importante dans la MO que dans le sang avec une médiane de 52% et 38%, respectivement ( $p=0,0307$ ). Les LyB expriment tous les antigènes de surface pan-B CD20, CD79b et CD22 et pour la majorité l'IgM et l'IgD (86% et 91% des patients, respectivement). Les marqueurs FMC7 (76% des patients), CD25 (70%), CD1c (62%) et CD38 (53%) sont souvent exprimés avec une distribution hétérogène selon les patients. Les marqueurs CD23 (31% des patients), CD11c (24%), CD5 (16%), CD43 (12%) et CD10 (4%) sont rarement positifs et le CD103 toujours négatif.

L'évaluation d'une partie de ces marqueurs a été arrêtée au laboratoire après cette période. Nous nous sommes ainsi intéressés plus spécifiquement à ceux réalisés à partir de 2015.

## I.2. Evaluation des immunophénotypages réalisés depuis 2015

### I.2.1 Impact de l'effet temps sur les résultats d'immunophénotypage

Nous avons étudié les marqueurs phénotypiques exprimés par les LyB pathologiques dans des échantillons prélevés sur une période de six ans. Une ACP a été effectuée sur le groupe d'échantillons médullaires de patients ayant une MW (n=86) pour évaluer les éventuelles variations phénotypiques liées aux modifications techniques au cours des années (Figure 14). Les marqueurs les moins discriminants entre les patients (pourcentages de CD20, CD79b, CD22 et MFI du CD19, CD20, CD79b et CD22) ont été choisis pour ne pas introduire de biais.



#### **Figure 14 : Evaluation des variations phénotypiques selon les années.**

Représentation graphique d'une ACP des pourcentages de CD20, CD79b, CD22 et des MFI du CD19, CD20, CD79b et CD22 de 86 patients atteints de MW selon l'année de l'immunophénotypage médullaire. Chaque patient est identifié par un symbole dont la forme et la couleur correspondent à l'année du prélèvement. Le centre de gravité de chaque groupe est représenté par un symbole de taille plus grande que les symboles du groupe. Chaque ellipse de concentration contient 50% des individus.

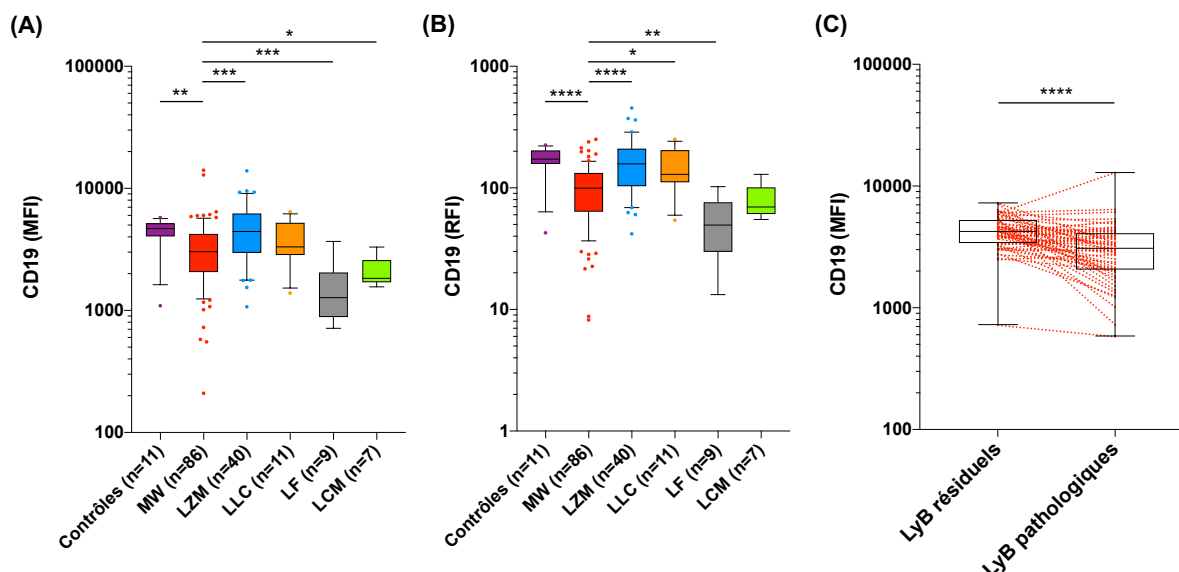
La répartition homogène des patients, confirmée par le recouvrement des ellipses de concentration, indique qu'il n'existe pas de variation majeure en fonction du temps, rendant exploitable la comparaison des résultats d'immunophénotypage entre eux. Les symboles isolés s'expliquent par les variations phénotypiques propres à chaque patient.

### I.2.2 Antigènes étudiés à la surface des LyB

Les données de réanalyse des immunophénotypages des onze sujets contrôles et 153 patients répartis en cinq groupes de SLP-B sont présentées ci-dessous et résumées dans les Annexes 1 et 2.

### 1.2.2.1. Expression phénotypique du CD19

Les LyB normaux (groupe contrôles) et pathologiques (différents groupes de SLP-B) expriment tous le CD19, avec des variations de fluorescence selon les patients.



**Figure 15 : Expression du CD19 à la surface des LyB normaux et pathologiques.**

A et B. Intensité de fluorescence du CD19 exprimée en MFI et en RFI selon les groupes d'individus. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'intervalle interquartile 25-75% (IIQ) et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. C. MFI du CD19 sur les LyB résiduels et pathologiques pour 57 patients ayant une MW. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le minimum et maximum. \* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,001 ; \*\*\*\* p<0,0001.

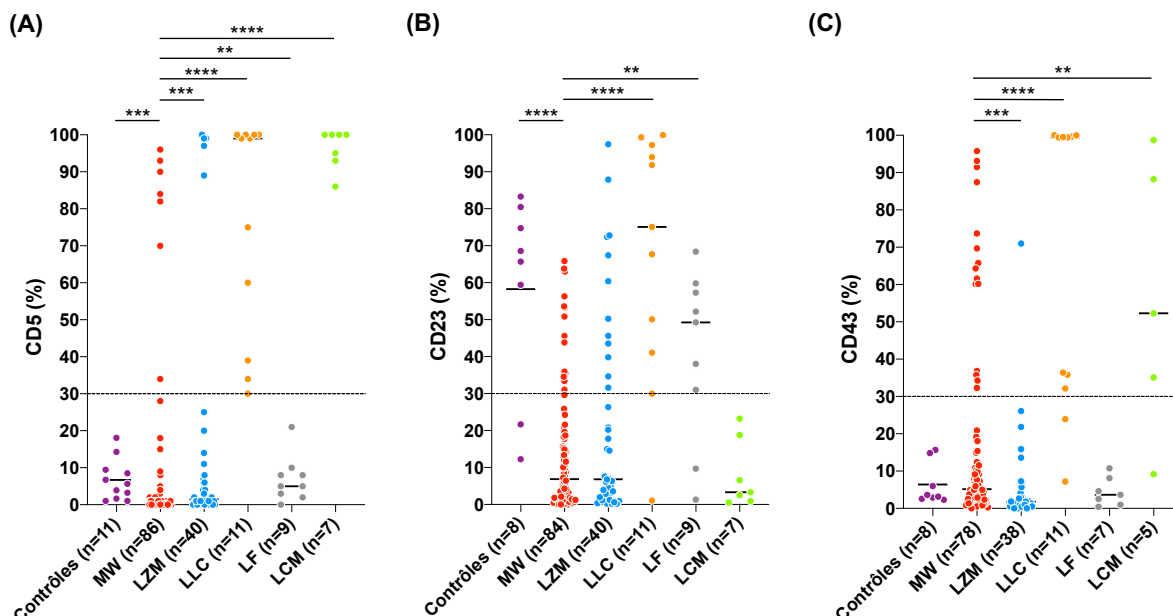
Dans le groupe MW, la médiane d'infiltration médullaire par les LyB pathologiques est de 45% (2-92%) parmi les Ly totaux et de 9% (1-67%) parmi les cellules totales. Les LyB pathologiques de la MW présentent une expression significativement plus faible du CD19 par rapport aux LyB normaux du groupe contrôle (p=0,0089) et aux LyB pathologiques du groupe LZM (p=0,0006) (Figure 15A-B).

La comparaison des MFI des LyB pathologiques avec celles des LyB résiduels pour 57 patients atteints de MW confirme cette diminution de fluorescence (p<0,0001) (Figure 15C). Seize d'entre eux ont un ratio de MFI des LyB pathologiques / MFI des LyB résiduels  $\leq 0,5$ . Le LF présente une expression du CD19 statistiquement plus faible que la MW (p=0,0009). Les variations de fluorescence sont moins significatives entre la MW et les groupes LLC et LCM.

### 1.2.2.2. Marqueurs majoritairement négatifs dans la MW

Les LyB sont majoritairement négatifs pour le **CD5** dans la MW (91% des patients), le LZM et LF, à l'inverse des LyB des groupes LLC et LCM (Figure 16A). Lorsqu'il est positif, le CD5 a une médiane d'expression de 87% dans la MW contre 99% pour le LZM. Dans la MW, son intensité de fluorescence est très variable avec une MFI allant de 108 à 1339.

L'antigène de surface **CD23** est souvent négatif dans la MW, le LZM et le LCM (Figure 16B). Seulement 18% des patients présentent un CD23  $\geq 30\%$  dans la MW, avec une intensité faible (MFI maximale égale à 666). Les LyB des individus contrôles et ayant une LLC ( $p < 0,0001$ ) ou un LF ( $p = 0,0016$ ) expriment significativement ce marqueur par rapport à ceux ayant une MW. Dans le groupe MW, seul un patient présente une co-expression du CD5 et du CD23.



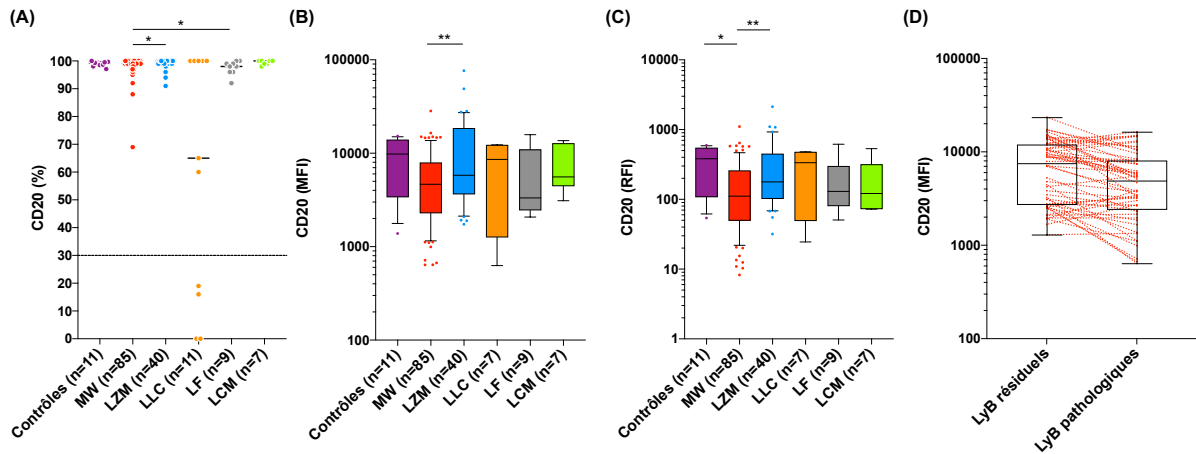
**Figure 16 : Expression du CD5, CD23 et CD43 à la surface des LyB normaux et pathologiques.** Pourcentages d'expression du CD5 (A), CD23 (B) et CD43 (C) à la surface des Ly B normaux (groupe contrôle) ou pathologiques. La médiane est symbolisée par un trait noir plein. Le trait noir en pointillé représente le seuil de 30% au-delà duquel le marqueur est considéré comme positif. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Le **CD43** est exprimé chez 22% des patients ayant une MW alors qu'il est négatif pour 97% des patients ayant un LZM ( $p = 0,0002$ ) (Figure 16C). Tout comme le CD5, il est majoritairement positif dans la LLC et le LCM (82% et 80% des patients, respectivement) et absent des LyB pathologiques du LF ou des LyB normaux des contrôles.

### 1.2.2.3. Marqueurs majoritairement positifs dans la MW

#### ➤ Expression du CD20

Le CD20 est un antigène exprimé à la surface des LyB normaux et pathologiques chez l'ensemble des individus analysés à l'exception du groupe LLC pour lequel 36% des patients n'expriment pas ou faiblement ce marqueur (Figure 17A). Son intensité de fluorescence est significativement plus faible dans la MW par rapport aux patients ayant un LZM ( $p = 0,0056$ ) (Figure 17B-C). Aucune différence significative n'est observée avec les patients du groupe LLC, trois d'entre eux présentant une LLC atypique avec une importante expression du CD20. La diminution de fluorescence du CD20 à la surface des LyB pathologiques par rapport aux LyB résiduels n'est pas significativement différente dans le groupe MW (Figure 17D).

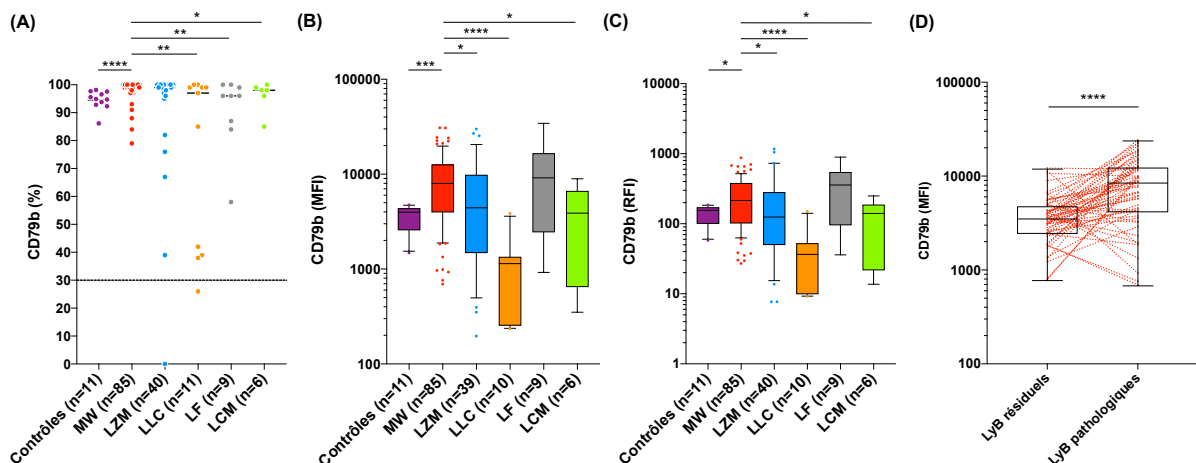


**Figure 17 : Expression du CD20 à la surface des LyB normaux et pathologiques.**

A. Pourcentage d'expression du CD20 selon les groupes d'individus avec la médiane symbolisée par un trait noir plein. Le trait noir en pointillé représente le seuil de 30% au-delà duquel le marqueur est considéré comme positif. B et C. Intensité de fluorescence du CD20 exprimée en MFI et en RFI selon les groupes d'individus. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. D. Moyenne de fluorescence du CD20 sur les LyB résiduels et pathologiques pour 56 patients ayant une MW. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le minimum et maximum. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$ .

### ➤ Expression du CD79b

Le CD79b est exprimé chez tous les contrôles et la majorité des patients ayant un SLP-B. Le pourcentage médian est de 100% chez les patients ayant une MW contre 95% pour les sujets contrôles ( $p < 0,0001$ ) et 99% pour les LZM (Figure 18A). Son intensité de fluorescence à la surface des LyB est significativement plus élevée dans les groupes MW et LF par rapport aux groupes Contrôles ( $p = 0,001$ ) et LZM ( $p = 0,0127$ ) (Figure 18B-C). Les patients ayant une LLC présentent une intensité de fluorescence significativement plus faible comparativement au groupe MW ( $p < 0,0001$ ).



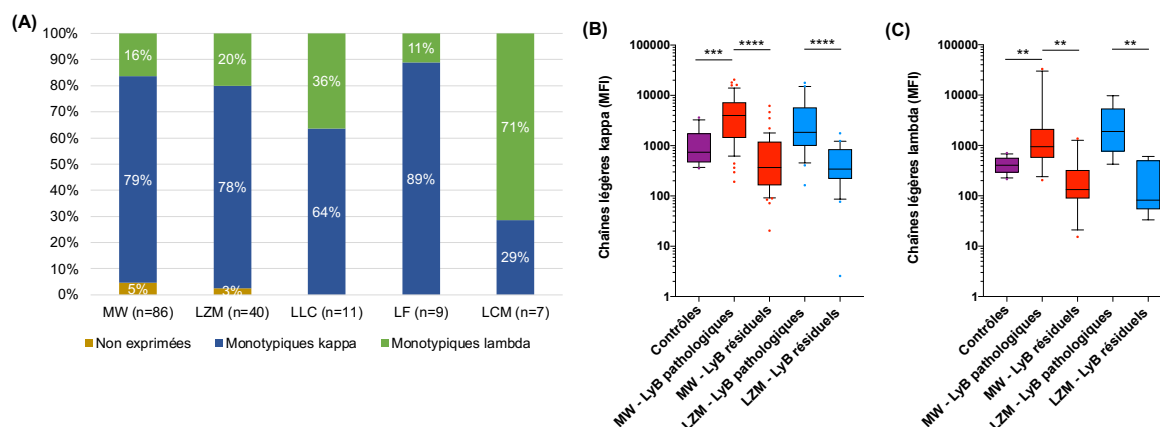
**Figure 18 : Expression du CD79b à la surface des LyB normaux et pathologiques.**

A. Pourcentage d'expression du CD79b selon les groupes d'individus avec la médiane symbolisée par un trait noir plein. Le trait noir en pointillé représente le seuil de 30% au-delà duquel le marqueur est considéré comme positif. B et C. Intensité de fluorescence du CD79b exprimée en MFI et en RFI selon les groupes d'individus. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. D. Moyenne de fluorescence du CD79b sur les LyB résiduels et pathologiques pour 56 patients ayant une MW. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le minimum et maximum. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

La comparaison de la MFI des LyB pathologiques avec celle des LyB résiduels pour 56 patients ayant une MW confirme cette augmentation significative de fluorescence (Figure 18D). 68% d'entre eux (38 patients) ont un ratio de MFI des LyB pathologiques / MFI des LyB résiduels  $\geq 2$  ( $p < 0,0001$ ).

### ➤ Expression de la chaîne légère de l'Ig de surface

Les LyB pathologiques, lorsqu'ils expriment une Ig de surface, ont tous une chaîne légère identique. La répartition de l'expression de la chaîne légère monotypique  $\kappa$  ou  $\lambda$  ou l'absence d'expression de ces chaînes est présentée sur la Figure 19A.



**Figure 19 : Expression des chaînes légères à la surface des LyB pathologiques.**

A. Répartition de l'expression des chaînes légères à la surface des LyB en fonction des pathologies. B. Intensité de fluorescence de la chaîne légère  $\kappa$  exprimée en MFI sur les LyB du groupe contrôle (n=11), les LyB pathologiques et les LyB résiduels dans le groupe MW (n=47) et LZM (n=21). Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. C. Intensité de fluorescence de la chaîne légère  $\lambda$  exprimée en MFI sur les LyB du groupe contrôle (n=11), les LyB pathologiques et les LyB résiduels dans le groupe MW (n=10) et LZM (n=6). Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

La distribution de la monotypie des chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$  est identique entre les patients des groupes MW et LZM, avec une prédominance de la chaîne  $\kappa$  par rapport à la chaîne  $\lambda$  (ratio 5:1). A la surface des LyB pathologiques, l'intensité de fluorescence des chaînes légères  $\kappa$  ou  $\lambda$  est significativement plus forte qu'à la surface des LyB résiduels dans les groupes MW ( $p < 0,0001$  et  $p = 0,0015$ ) et LZM ( $p < 0,0001$  et  $p = 0,0087$ ) respectivement (Figure 19B-C). Cette observation est confirmée en comparant, à la surface des LyB pathologiques du groupe MW et des LyB normaux du groupe de sujets contrôles, les intensités de fluorescence des chaînes légères  $\kappa$  ( $p = 0,0003$ ) (Figure 19B) et  $\lambda$  ( $p = 0,0048$ ) (Figure 19C). Les intensités de fluorescence des chaînes légères sur les LyB pathologiques ne sont pas significativement différentes entre les groupes MW et LZM.

Concernant la LLC, le LF et le LCM, les effectifs sont trop faibles pour comparer la prédominance des chaînes légères  $\kappa$  ou  $\lambda$  à la surface des LyB pathologiques ainsi que les intensités de fluorescence.

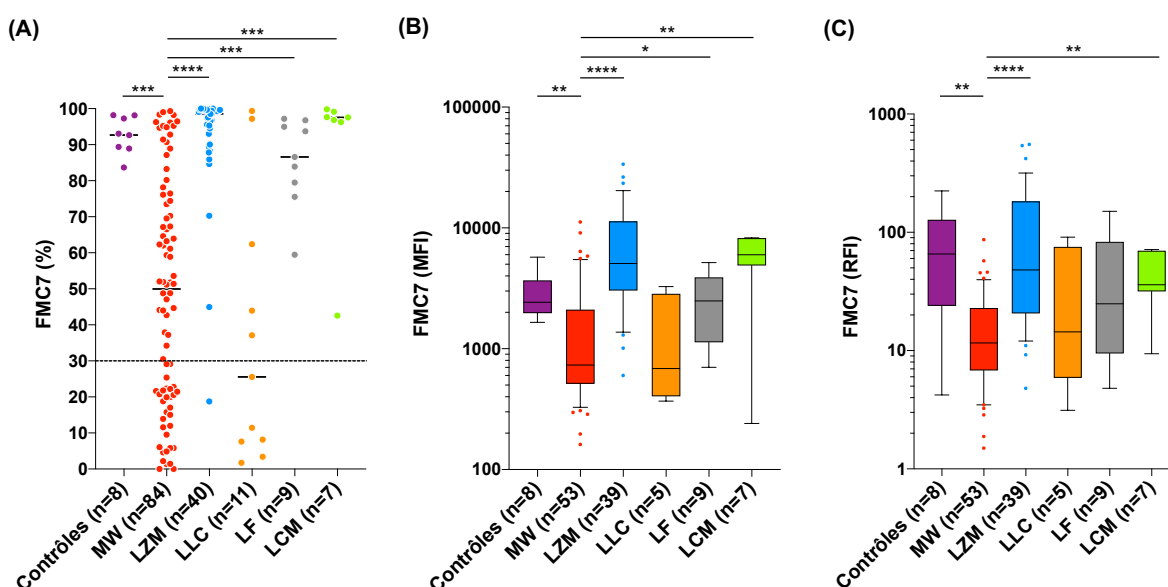
En collaboration avec l'Établissement Français du Sang en 2015, l'équipe du laboratoire a analysé par CMF les prélèvements sanguins de 37 individus sains. Les résultats mettent en évidence une grande variabilité des MFI des chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$ , bien plus importante que celle du CD79b (Tableau 9). Cette dispersion des MFI des chaînes légères chez les sujets sains rend ce paramètre plus difficilement comparable entre nos groupes de patients.

	CD79b (MFI)	Chaîne légère $\kappa$ (MFI)	Chaîne légère $\lambda$ (MFI)
Moyenne $\pm$ écart-type	6603 $\pm$ 1314	9381 $\pm$ 5002	10794 $\pm$ 6630
Coefficient de variation	20	53	61
Minimum-Maximum	4291-9057	2089-22583	2341-28575

**Tableau 9** : MFI du CD79b et des chaînes légères à la surface des LyB normaux.

### ➤ Expression du FMC7

A la différence des marqueurs détaillés précédemment où les pourcentages d'expression sont relativement homogènes, nous observons une grande hétérogénéité du FMC7 dans la MW avec une médiane à 50% et un [IIQ] de [21%-76%] (Figure 20A). Ces résultats diffèrent significativement de ceux obtenus pour les contrôles ( $p=0,0001$ ), le LZM ( $p<0,0001$ ), le LF ( $p=0,0008$ ) et le LCM ( $p=0,0002$ ) qui expriment majoritairement cet antigène. Les patients du groupe LLC présentent dans la plupart des cas une faible expression du FMC7.



**Figure 20** : Expression du FMC7 à la surface des LyB normaux et pathologiques.

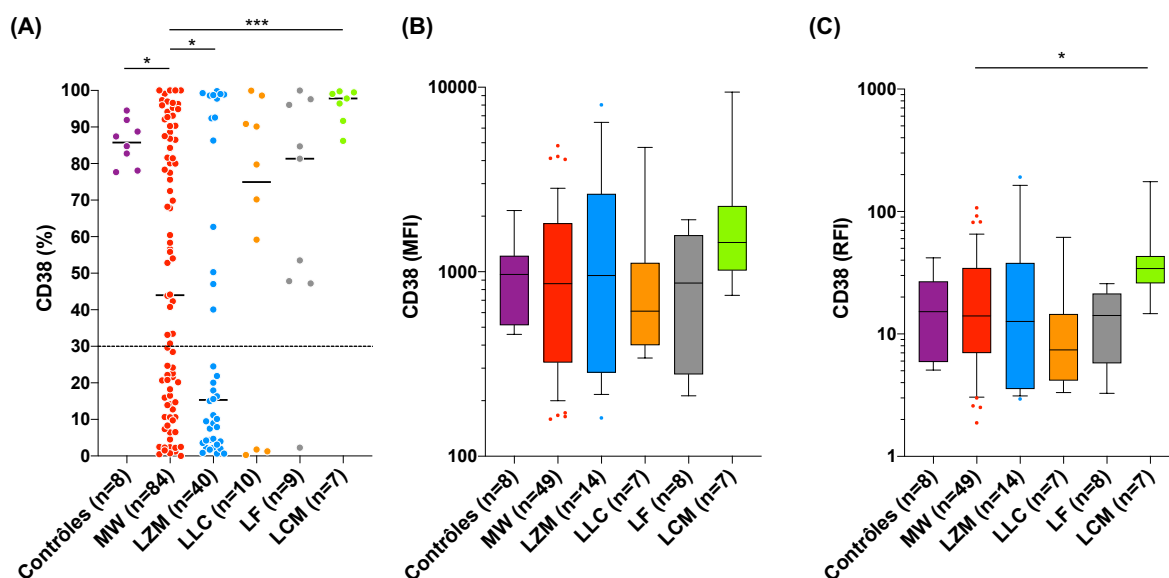
A. Pourcentage d'expression du FMC7 selon les groupes d'individus avec la médiane symbolisée par un trait noir. Le trait noir en pointillé représente le seuil de 30% au-delà duquel le marqueur est considéré comme positif. B et C. Intensité de fluorescence du FMC7 exprimée en MFI et en RFI selon les groupes d'individus. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. \*  $p<0,05$  ; \*\*  $p<0,01$  ; \*\*\*  $p<0,001$  ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ .

Dans la MW, la MFI du FMC7 à la surface des LyB pathologiques est significativement plus faible que pour les autres groupes, à l'exception de la LLC (Figure 20B-C). Compte tenu de l'hétérogénéité d'expression de ce marqueur entre les patients ayant une MW, les MFI entre les LyB résiduels et les LyB pathologiques n'ont pas été comparées.



## ➤ Expression du CD38

Tout comme le FMC7, il existe une hétérogénéité d'expression du CD38 à la surface des LyB pathologiques des patients ayant une MW. Certains patients sont très positifs pour ce marqueur tandis que d'autres ne l'expriment pas ou faiblement (médiane égale à 44% avec un [IIQ] de 14%-87%) (Figure 21A). Les LyB des individus contrôles et des patients avec un LCM expriment tous le CD38 avec un pourcentage significativement plus élevé pour le LCM comparé à la MW ( $p=0,0002$ ). Concernant le LZM, 65% des patients présentent un pourcentage de CD38 inférieur à 30% contre 42% dans la MW ( $p=0,0389$ ).



**Figure 21 : Expression du CD38 à la surface des LyB normaux et pathologiques.**

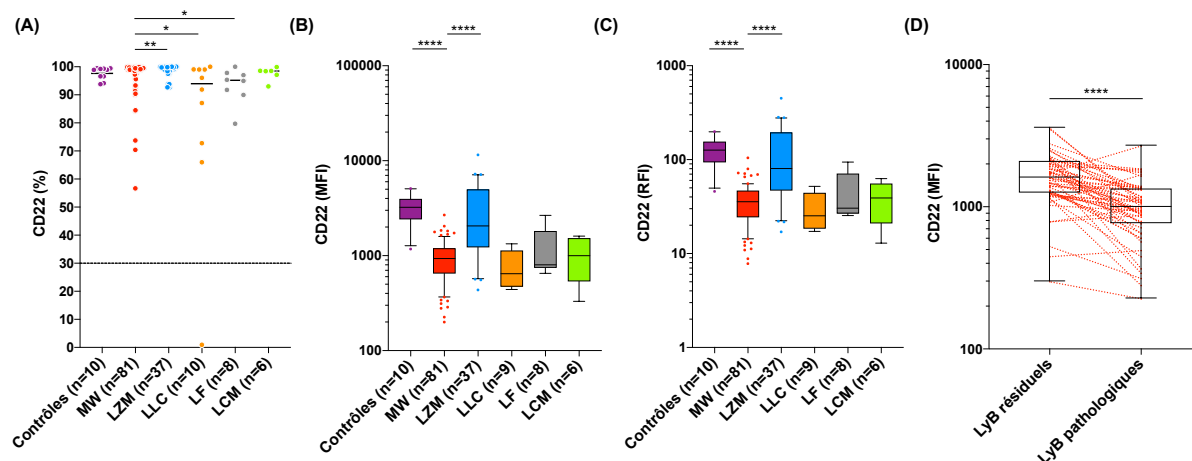
A. Pourcentage d'expression du CD38 selon les groupes d'individus avec la médiane symbolisée par un trait noir. Le trait noir en pointillé représente le seuil de 30% au-delà duquel le marqueur est considéré comme positif. B et C. Intensité de fluorescence du CD38 exprimée en MFI et en RFI selon les groupes d'individus. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

L'intensité de fluorescence du CD38 n'est pas significativement différente entre les groupes, avec une tendance à l'exprimer plus fortement pour le LCM (Figure 21B-C). L'expression de cet antigène étant très hétérogène entre les patients ayant une MW, les MFI entre les LyB résiduels et les LyB pathologiques n'ont pas été comparées.

L'estimation du pourcentage de plasmocytes CD38<sup>+</sup> aussi bien dans les prélèvements médullaires que sanguins montre qu'il n'existe pas de différence significative entre les groupes. Le pourcentage médullaire médian de plasmocytes est faible et égal à 0,2% dans notre cohorte de patients MW.

## ➤ Expression du CD22

Tous les individus, à l'exception d'un patient ayant une LLC, expriment l'antigène CD22 à la surface des LyB normaux et pathologiques, avec des variations d'intensité de fluorescence selon les groupes (Figure 22A-C). Les patients ayant une MW présentent une plus faible expression du CD22 par rapport aux contrôles et au groupe de LZM ( $p < 0,0001$ ).



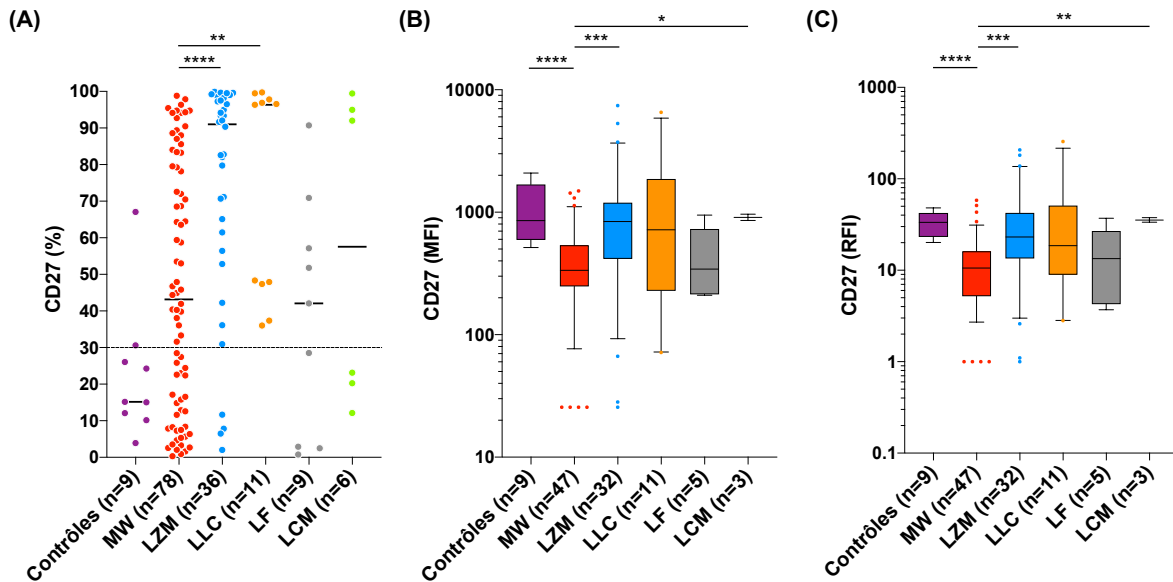
**Figure 22 : Expression du CD22 à la surface des LyB normaux et pathologiques.**

A. Pourcentage d'expression du CD22 selon les groupes d'individus avec la médiane symbolisée par un trait noir plein. Le trait noir en pointillé représente le seuil de 30% au-delà duquel le marqueur est considéré comme positif. B et C. Intensité de fluorescence du CD22 exprimée en MFI et en RFI selon les groupes d'individus. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. D. Moyenne de fluorescence du CD22 sur les LyB résiduels et pathologiques pour 55 patients ayant une MW. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le minimum et maximum. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Cette diminution de fluorescence est confirmée par la comparaison des MFI entre les LyB résiduels et les LyB pathologiques de 55 patients ayant une MW (Figure 22D). Parmi eux, vingt présentent un ratio de MFI des LyB pathologiques / MFI des LyB résiduels  $\leq 0,5$  ( $p < 0,0001$ ). La LLC, le LF et le LCM ne se démarquent pas de la MW.

## ➤ Expression du CD27

Le pourcentage médian de LyB mémoires CD27<sup>+</sup> est de 15% chez les sujets contrôles (Figure 23A). Dans le groupe MW, l'expression de cet antigène est très hétérogène entre les patients tandis qu'elle est significativement augmentée chez les patients ayant un LZM ( $p < 0,0001$ ) ou une LLC ( $p = 0,0036$ ). Les LyB de la MW expriment plus faiblement le CD27 par rapport aux LyB mémoires des groupes contrôles ( $p < 0,0001$ ) et LZM ( $p = 0,0001$ ) (Figure 23B-C). La différence d'intensité de fluorescence observée dans le LCM est d'interprétation délicate, seuls trois patients ayant des LyB CD27<sup>+</sup> en quantité suffisante pour être évalués. La MFI des LyB résiduels n'a pas été comparée à celle des LyB pathologiques dans le groupe MW, compte tenu d'une trop faible quantité de LyB résiduels mémoires, ne permettant pas une analyse fiable des résultats.

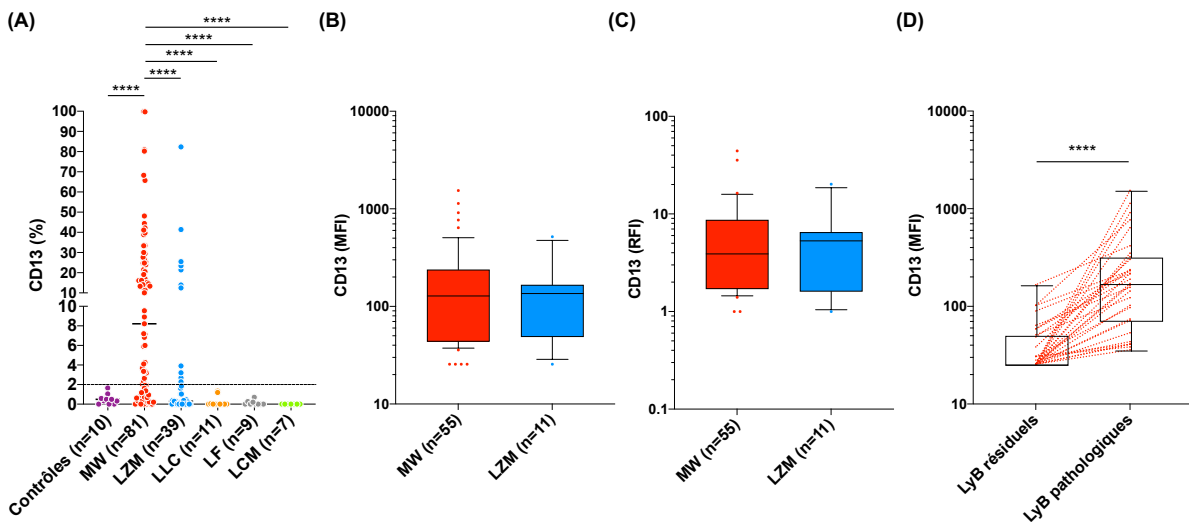


**Figure 23 : Expression du CD27 à la surface des LyB normaux et pathologiques.**

A. Pourcentage d'expression du CD27 selon les groupes d'individus avec la médiane symbolisée par un trait noir plein. Le trait noir en pointillé représente le seuil de 30% au-delà duquel le marqueur est considéré comme positif. B et C. Intensité de fluorescence du CD27 exprimée en MFI et en RFI selon les groupes d'individus. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. \* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,001 ; \*\*\*\* p<0,0001.

### ➤ Expression du CD13

Le CD13 est préférentiellement exprimé sur les LyB pathologiques de la MW et plus rarement sur ceux du LZM (p<0,0001) (Figure 24A). Il n'est pas exprimé à la surface des LyB des autres groupes (p<0,0001) de notre cohorte. Le pourcentage médian d'expression du CD13 est de 8,2% dans la MW tandis qu'il est égal à 0,3% dans le groupe LZM.



**Figure 24 : Expression du CD13 à la surface des LyB normaux et pathologiques.**

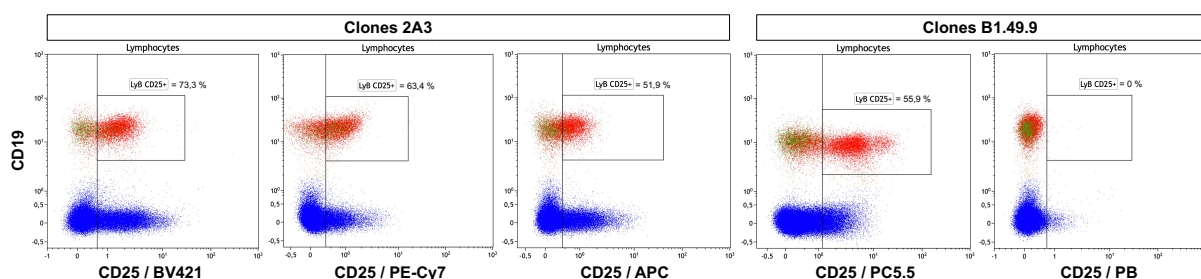
A. Pourcentage d'expression du CD13 selon les groupes d'individus avec la médiane symbolisée par un trait noir plein. Le trait noir en pointillé représente le seuil de 2% au-delà duquel le marqueur est considéré comme positif. B et C. Intensité de fluorescence du CD13 exprimée en MFI et en RFI dans la MW et le LZM. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. D. Moyenne de fluorescence du CD13 sur les LyB résiduels et pathologiques pour 31 patients ayant une MW. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le minimum et maximum. \* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,001 ; \*\*\*\* p<0,0001.

L'intensité de fluorescence du CD13 pour les patients ayant une expression supérieure ou égale à 2% ne varie pas significativement entre la MW et le LZM (Figure 24B-C). La comparaison des MFI du CD13 entre les LyB résiduels et les LyB pathologiques de 31 patients ayant une MW montre que seuls les LyB pathologiques expriment le CD13, les LyB résiduels n'exprimant pas ou très peu ce marqueur ( $p < 0,0001$ ) (Figure 24D).

### ➤ Expression du CD25

Marqueur important de la MW, le CD25 n'a pu être évalué sur cette cohorte de réanalyse en raison d'un biais lié au changement d'anticorps utilisé au laboratoire à partir de 2015.

Pour comprendre la réactivité variable des anticorps anti-CD25 utilisés au laboratoire avant et après 2015, cinq anticorps anti-CD25 (deux clones différents), couplés à différents fluorochromes, ont été évalués sur six prélèvements sanguins de patients ayant une MW. Les résultats confirment une réactivité variable selon les anticorps utilisés, qui dépend davantage du fluorochrome utilisé que du clone (Figure 25). Nous obtenons une bonne séparation des LyB et LyT CD25<sup>+</sup> avec le clone 2A3 couplé au BV421, et le clone B1.49.9 couplé à la PC5.5. En revanche, le clone B1.49.9 associé au PB ne permet pas la détection de cellules CD25<sup>+</sup> chez les patients évalués. Le clone 2A3 couplé à l'APC ou à la PE-Cy7 présente une réactivité plus faible (moins bonne séparation des LyB CD25<sup>+</sup> et des LyB CD25<sup>-</sup>) voire une absence de réactivité pour un patient avec la PE-Cy7.



**Figure 25 : Expression du CD25 à la surface des Ly chez un patient ayant une MW.**

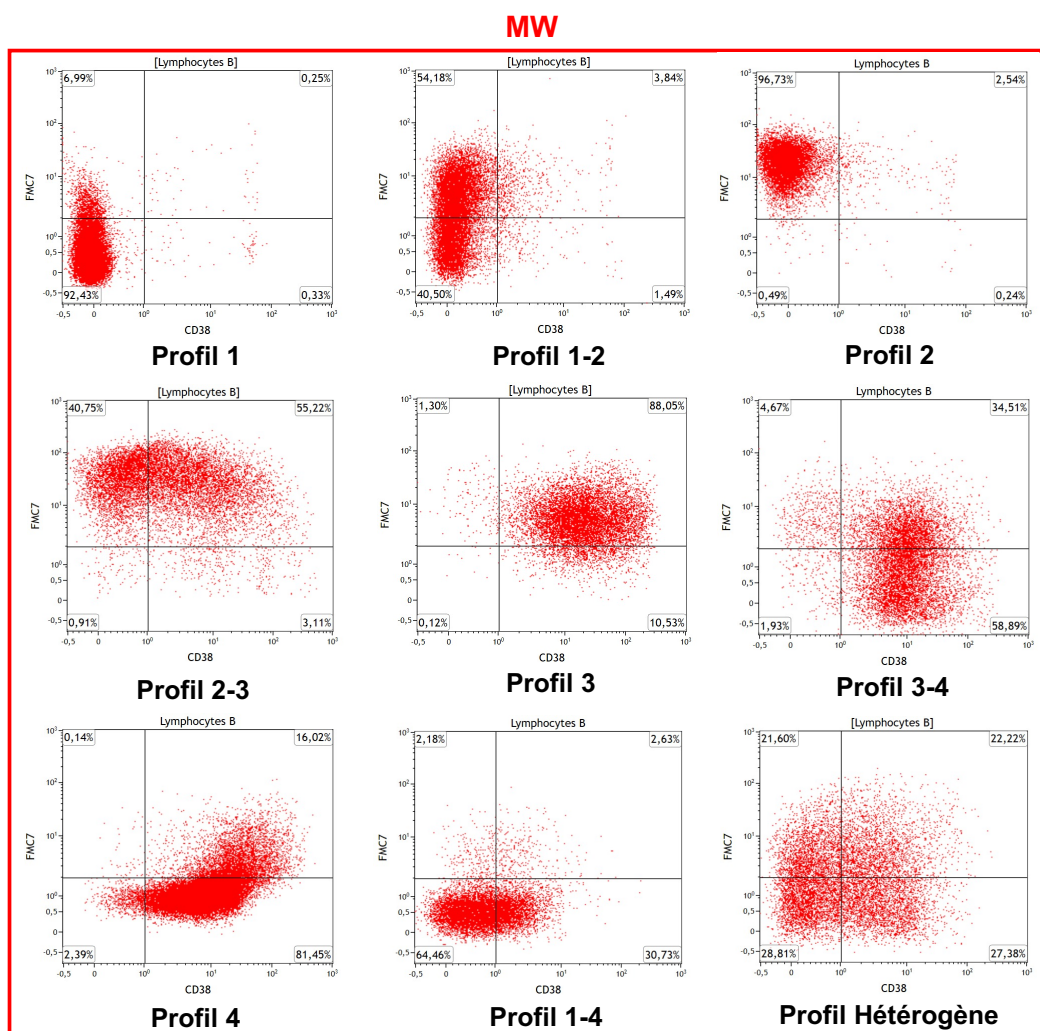
Représentation bi-paramétrique CD19/CD25 selon deux clones d'anticorps anti-CD25 couplés à différents fluorochromes. Les LyT sont représentés en bleu, les LyB pathologiques en rouge et les LyB résiduels en vert.

Pour apprécier l'intérêt du CD25 à distinguer la MW du LZM, nous avons donc réanalysé des immunophénotypages de patients ayant une MW (n=20) ou un LZM (n=19), antérieurs à 2015 avec un anticorps anti-CD25 fonctionnel. L'expression du CD25 à la surface des LyB pathologiques est significativement augmentée dans la MW par rapport au LZM, avec une médiane de 75% contre 47% respectivement ( $p=0,0099$ ). L'intensité de fluorescence quant à elle ne varie pas entre ces deux groupes.

### 1.2.3 Hétérogénéité du profil FMC7/CD38

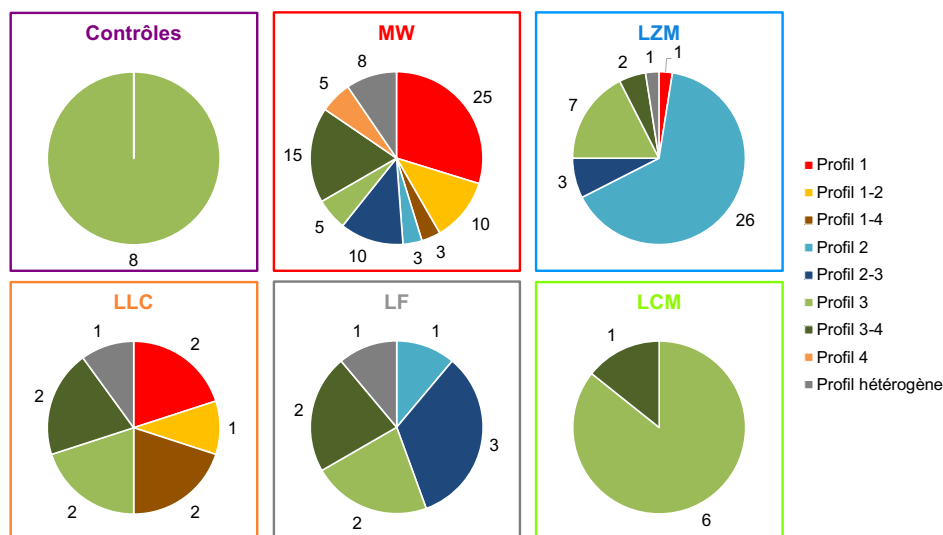
Il existe une importante hétérogénéité d'expression de certains marqueurs phénotypiques (FMC7, CD38, CD27, CD13) à la surface des LyB pathologiques des patients ayant une MW (Annexe 3). Peu de corrélations ressortent significatives entre les différents antigènes de surface exprimés à la surface des LyB pathologiques (Annexe 4). La corrélation la plus significative concerne le pourcentage de CD38 positivement corrélé au pourcentage de FMC7 ( $p=0,0030$ ).

Nous nous sommes donc intéressés à la répartition de l'expression des antigènes FMC7 et CD38 à la surface des LyB pathologiques sur une représentation bi-paramétrique FMC7/CD38. Compte tenu de leur hétérogénéité respective, nous mettons en évidence neuf profils phénotypiques différents sur les prélèvements médullaires de patients atteints de MW, détaillés dans la partie Patients et Méthodes (Figure 26).



**Figure 26 : Exemples de profils FMC7/CD38 observés sur les LyB pathologiques dans la MW.** Les LyB pathologiques sont colorés en rouge. Le pourcentage de LyB selon chaque quadrant est indiqué dans chaque angle.

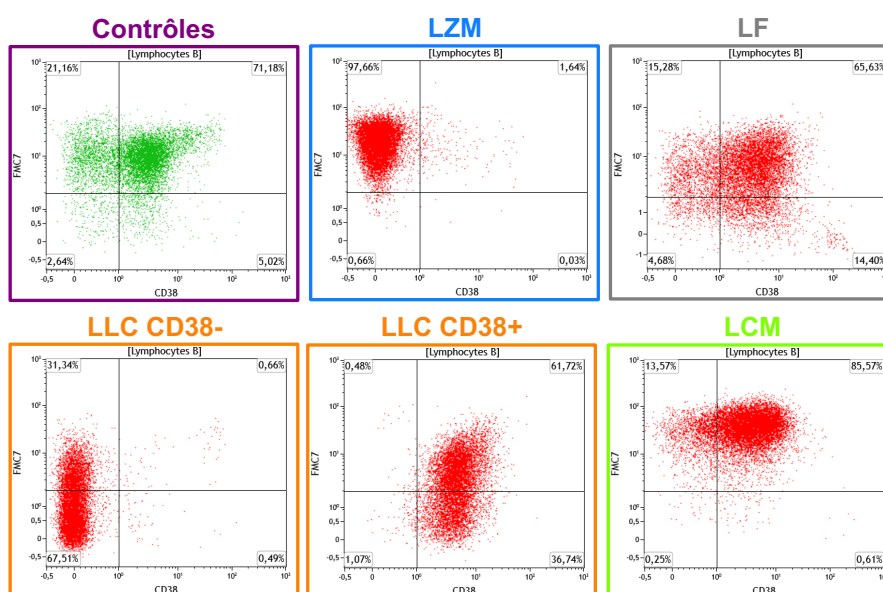
L'application de ces profils sur les autres groupes montre une répartition plus restreinte.



**Figure 27: Répartition des profils FMC7/CD38 observés sur les LyB selon les groupes.** Pour chaque groupe, les effectifs sont indiqués en fonction des profils.

Les individus du groupe contrôle ont tous le même profil FMC7/CD38 n°3, correspondant à une majorité de LyB FMC7<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> (Figure 27), tout comme 6 des 7 patients ayant un LCM. Cinquante-trois patients (63%) ayant une MW présentent un profil 1, 1-2, 1-4 ou 3-4 associé à une faible expression du FMC7 contre seulement quatre patients (10%) ayant un LZM. A l'inverse, dans le groupe LZM, 26 patients (65%) ont un profil n°2 avec une plus forte intensité du FMC7 contre trois patients ayant une MW (4%), avec des médianes de MFI égales à 5286 et 2419 respectivement ( $p=0,0409$ ). Dans notre cohorte, le profil 4 (FMC7/CD38<sup>+</sup>) est exclusivement retrouvé dans la MW, la LLC CD38<sup>+</sup> étant associée à une expression faible du FMC7 correspondant à un profil 3-4. Ainsi, la LLC caractérisée par une expression variable du CD38 ne se distingue pas de la MW sur ce profil FMC7/CD38.

Un exemple de profil FMC7/CD38 pour chaque groupe est présenté sur la Figure 28.



**Figure 28 : Exemple de profils FMC7/CD38 observés sur les LyB par groupe d'étude hors MW.** Les LyB polytypiques sont colorés en vert dans le groupe contrôle et les LyB pathologiques en rouge. Le pourcentage de LyB selon chaque quadrant est indiqué dans chaque angle.

#### 1.2.4 Analyses non supervisées des données phénotypiques

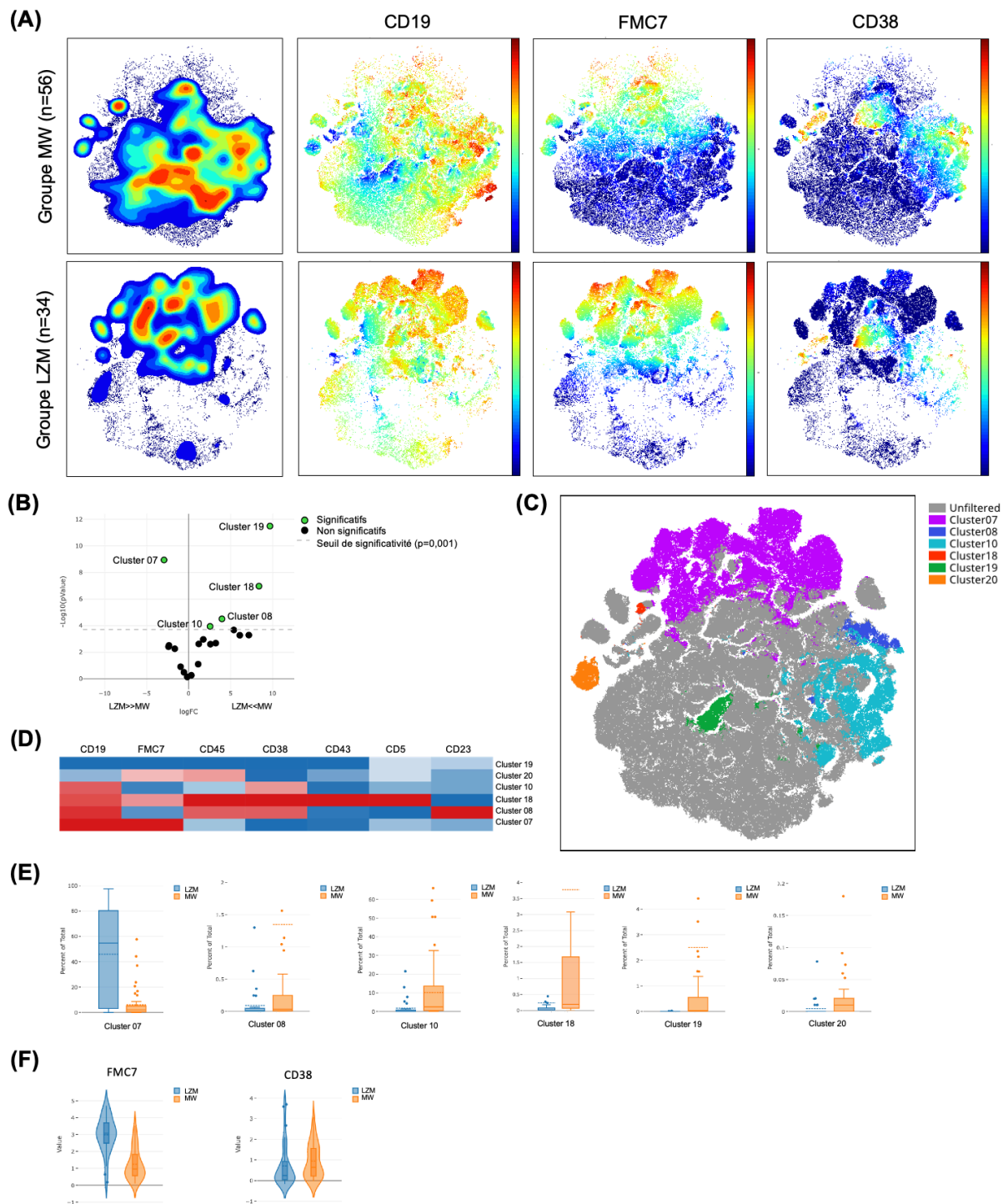
L'analyse non supervisée des données phénotypiques de certains patients des groupes MW (n=56) et LZM (n=34) confirme les résultats obtenus précédemment.

Les t-SNE obtenus en *density plot* à partir des fichiers d'acquisition du tube 4 mettent en évidence une répartition distincte des cellules entre les groupes MW et LZM (Figure 29A). La variation la plus significative concerne le FMC7 avec une intensité de fluorescence significativement augmentée dans le groupe LZM, qui s'accompagne d'une augmentation de l'intensité du CD19 (Figure 29A). Les cellules des patients ayant un LZM sont très représentées dans le cluster 07 correspondant à ces variations de fluorescence, à l'inverse de ceux ayant une MW (Figure 29B-E). Peu de patients présentent une augmentation d'expression du CD38, retrouvée notamment dans les clusters 08 et 10. Les *violin plots* des MFI du FMC7 et CD38 suivent la même tendance que les boîtes à moustaches obtenues en analyse non supervisée, avec une plus faible expression du FMC7 et une expression hétérogène du CD38 dans le groupe MW (Figure 29F).

Les t-SNE effectués avec les fichiers d'analyse du tube 5 révèlent des intensités de fluorescence faibles pour les antigènes de surface CD13, CD22 et CD27 (Figure 30A). Néanmoins six clusters montrent une différence significative entre les groupes MW et LZM (Figure 30B-E) :

- Les clusters 01 et 02 présentent une expression augmentée du CD22 avec une abondance des cellules de LZM par rapport aux cellules de MW.
- A l'inverse, les clusters 07 et 10 présentent une plus faible expression du CD22 et CD27 avec un grand nombre de cellules de la MW.
- Les clusters 12 et 14 qui représentent une expression augmentée du CD27 contiennent majoritairement des cellules du groupe LZM par rapport au groupe MW.

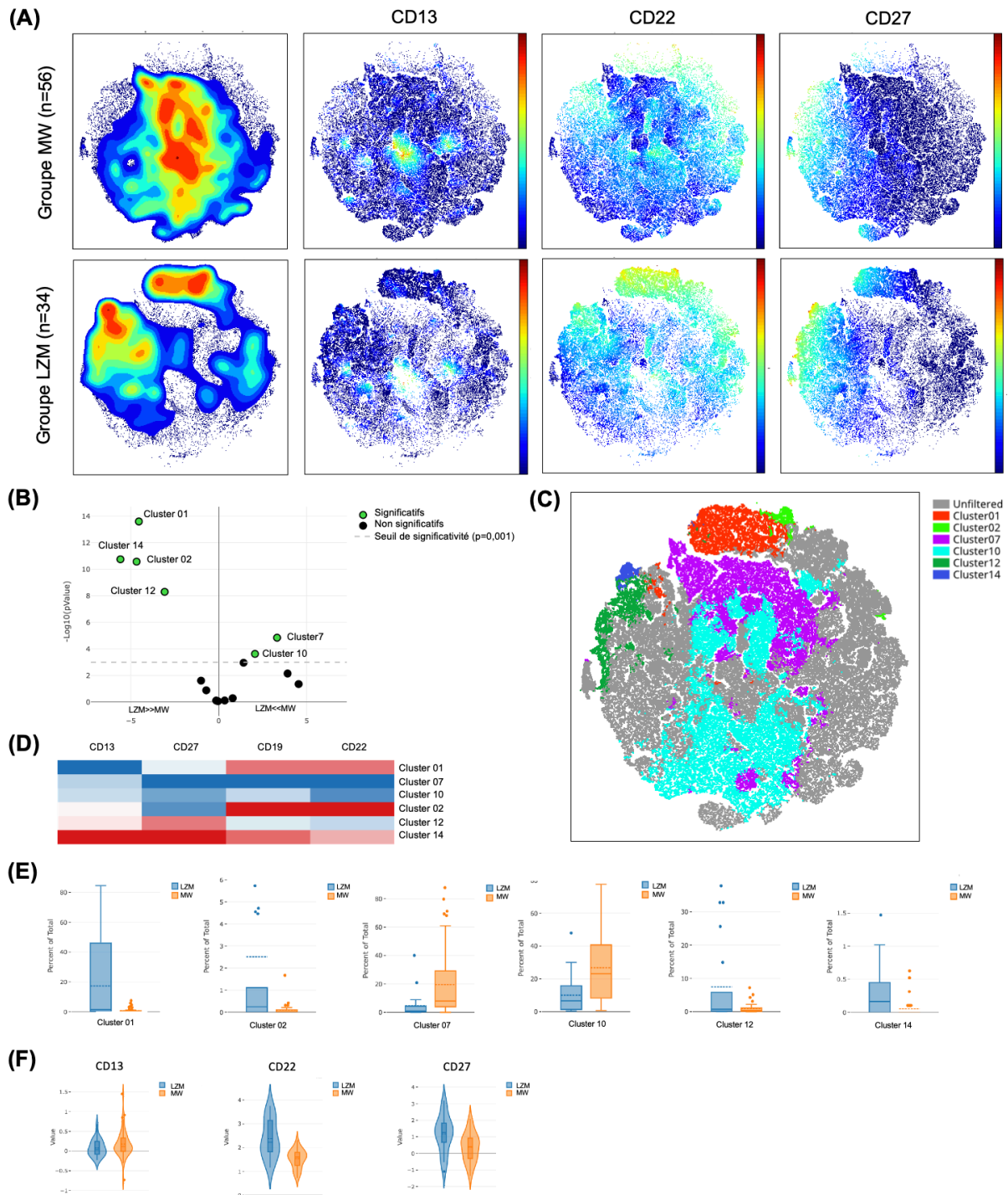
Les *violin plots* des MFI du CD22 et CD27 sont identiques aux résultats obtenus en analyse supervisée avec une plus faible expression du CD22 et CD27 dans la MW, confirmant l'analyse par cluster ci-dessus (Figure 30F). L'intensité de fluorescence du CD13 est similaire dans la MW et le LZM.



**Figure 29 : Analyse non supervisée des marqueurs phénotypiques du tube n°4 entre les groupes MW et LZM.**

A. Représentations t-SNE en gradient de densité (marqueurs utilisés : CD5, CD19, CD23, CD43, CD45, FMC7 et CD38, itération : 2000, perplexité : 50 et vitesse d'ajustement : 0,5) et en gradient de couleurs selon l'intensité de fluorescence des marqueurs phénotypiques les plus pertinents. B. *Volcano plot* indiquant les clusters selon leur degré de significativité défini sur la comparaison de l'abondance cellulaire entre les groupes MW et LZM. C. Représentation t-SNE avec mise en évidence des six clusters statistiquement significatifs ( $p < 0,001$ ). D. *Heatmap* avec la description du profil phénotypique de chaque cluster d'intérêt. E. Boîtes à moustaches du pourcentage des cellules (abondance) présentes dans chaque cluster d'intérêt selon le groupe MW ou LZM. F. MFI du FMC7 et CD38 sur les LyB pathologiques des groupes MW et LZM (*violinplots* avec des boîtes à moustaches représentant la médiane, l'IIQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles).





**Figure 30 : Analyse non supervisée des marqueurs phénotypiques du tube n°5 entre les groupes MW et LZM.**

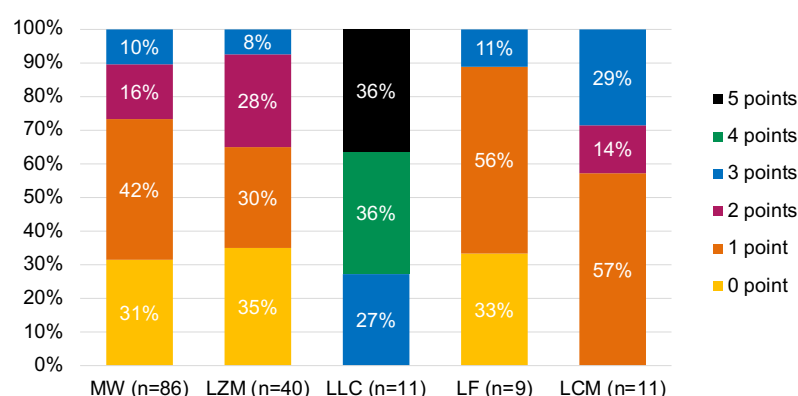
A. Représentations t-SNE en gradient de densité (marqueurs utilisés : CD13, CD19, CD22, CD27, CD45, itération : 2000, perplexité : 50 et vitesse d'ajustement : 0,5) et en gradient de couleurs selon l'intensité de fluorescence des marqueurs phénotypiques les plus pertinents. B. *Volcano plot* indiquant les clusters selon leur degré de significativité défini sur la comparaison de l'abondance cellulaire entre les groupes MW et LZM. C. Représentation t-SNE avec mise en évidence des six clusters statistiquement significatifs ( $p < 0,001$ ). D. *Heatmap* avec la description du profil phénotypique de chaque cluster d'intérêt. E. Boîtes à moustaches du pourcentage des cellules (abondance) présentes dans chaque cluster d'intérêt selon le groupe MW ou LZM. F. MFI du CD13, CD22 et CD27 sur les LyB pathologiques des groupes MW et LZM (*violinplots* avec des boîtes à moustaches représentant la médiane, l'IQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles).

## II. DETERMINATION ET APPLICATION DU SCORE PHENOTYPIQUE DE LA MW

A partir des variations phénotypiques observées précédemment, le deuxième objectif était d'établir un score phénotypique permettant de distinguer la MW des formes frontières et notamment du LZM.

### II.1. Sélection des patients

Toujours inférieur ou égal à 3 dans la MW, le score de Matutes permet de la distinguer de la LLC classique ayant un score à 4 ou 5 (Figure 31). La somme des points attribués est similaire entre la MW et les autres SLP-B de la cohorte et notamment le LZM, ce qui n'en fait pas un critère discriminant entre ces deux groupes.



**Figure 31** : Résultats du score de Matutes pour les différents SLP-B étudiés.

Pour construire le score phénotypique médullaire puis sanguin en faveur d'une MW, nous avons choisi de comparer uniquement les patients atteints d'une MW avec ceux ayant un LZM (Tableau 10), ces deux entités étant les plus difficiles à distinguer.

	MW (n=86)	LZM (n=40)	p-value
Hémoglobine, médiane (g/dL)	10,9	12,4	0,0643
Plaquettes, médiane (G/L)	245	180	<b>0,0064</b>
Lymphocytes, médiane (G/L)	1,70	3,76	<b>&lt;0,0001</b>
Présence d'une IgM, % (n)	100 (86)	38 (15)	<b>&lt;0,0001</b>
Taux du pic IgM (g/L)	12,6	3,7	<b>&lt;0,0001</b>
Mutation <i>MYD88</i> , %	96	42	<b>&lt;0,0001</b>

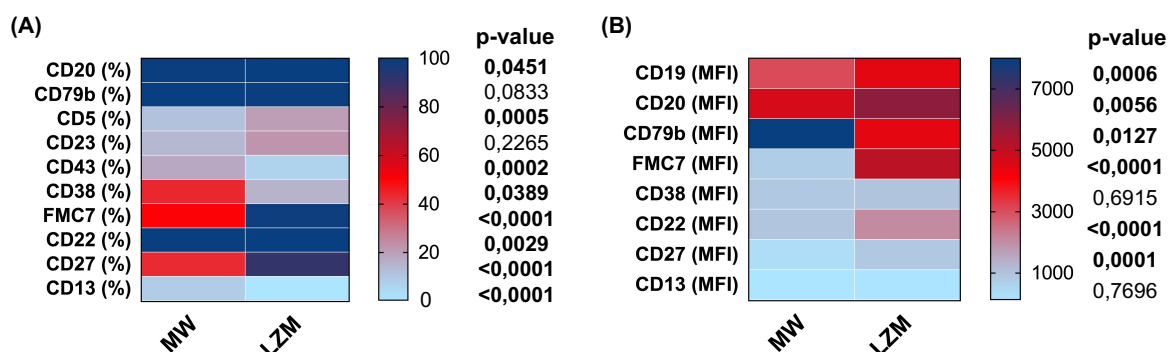
**Tableau 10** : Caractéristiques biologiques des patients MW et LZM.

Les patients ayant une MW présentent à la NFS un taux de Ly significativement plus faible que les patients du groupe LZM ( $p < 0,0001$ ). Par définition, ils ont tous un pic monoclonal IgM en immunochimie, avec un taux significativement supérieur à celui des patients (38%) ayant un LZM avec détection d'une IgM. La mutation *MYD88* est retrouvée chez 96% des patients atteints d'une MW contre 42% des patients ayant un LZM.

## II.2. Construction du score phénotypique médullaire de la MW

### II.2.1 Paramètres significatifs en analyses univariées

Comme évalués précédemment, plusieurs marqueurs phénotypiques sont significativement différents entre la MW et le LZM (Figure 32) : l'expression en pourcentage de CD20, CD5, CD43, CD38, FMC7, CD22, CD27 et CD13 et les intensités de fluorescence de CD19, CD20, CD79b, FMC7, CD22, CD27.



**Figure 32 : Expression des marqueurs phénotypiques entre la MW et le LZM.**

A. Représentation sous forme de *Heatmap* des médianes des pourcentages d'expression pour les groupes MW et LZM avec les p-values correspondantes. B. Représentation sous forme de *Heatmap* des médianes des MFI pour les groupes MW et LZM avec les p-values correspondantes.

### II.2.2 Analyses multivariées

#### II.2.2.1. Régression logistique sur les marqueurs significatifs

Grâce à un modèle de régression logistique, nous avons comparé ensemble les pourcentages d'expression significatifs d'une part et les MFI significatives d'autre part, en fonction du diagnostic posé de MW ou LZM (Tableau 11A-B).

Variabiles	z	p-value
CD5 (%)	-1.64	0.100
CD43 (%)	2.50	0.012
FMC7 (%)	-3.67	<0.0001
CD38 (%)	2.50	0.013
CD22 (%)	0.68	0.498
CD27 (%)	-1.34	0.179
CD13 (%)	2.42	0.015

Variabiles	z	p-value
CD19 (MFI)	0.85	0.395
CD20 (MFI)	0.14	0.890
CD79b (MFI)	-0.20	0.841
FMC7 (MFI)	-3.23	0.001
CD22 (MFI)	-2.54	0.011
CD27 (MFI)	-2.89	0.004

**Tableau 11 : Régressions logistiques des paramètres significatifs en analyse univariée.**

Résultats de la régression logistique sur les pourcentages d'expression (A) et les MFI (B) des marqueurs significatifs entre la MW et le LZM. La valeur z représente le coefficient de régression divisé par l'erreur standard. Une valeur de z négative est en faveur d'une diminution tandis qu'un z positif est en faveur d'une augmentation du paramètre étudié.

Les pourcentages de CD43, FMC7, CD38, CD13 et les MFI du FMC7, CD22 et CD27 restent significativement pertinents pour distinguer la MW du LZM. Un pourcentage diminué de FMC7 et une expression augmentée de CD43, CD38 et CD13 sont en faveur d'un diagnostic de MW, tout comme la diminution des MFI du FMC7, CD22 et CD27.

### II.2.2.2. Application d'un modèle de prédiction et ACP

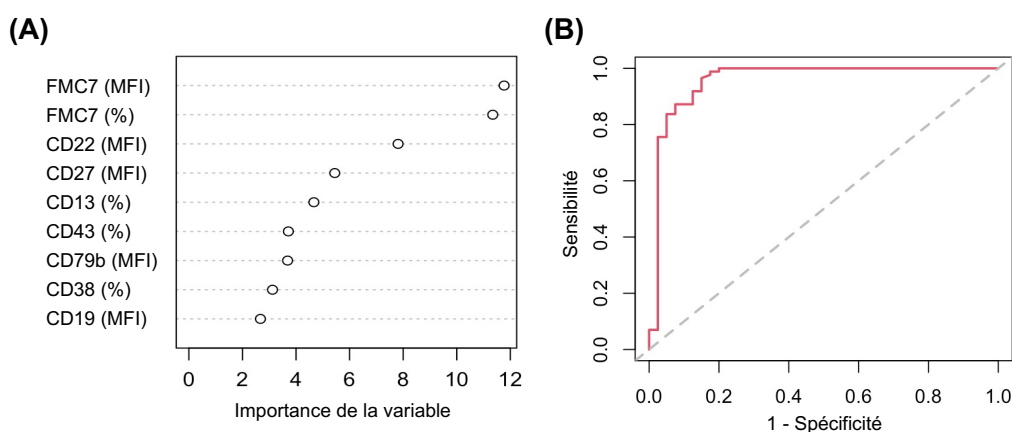
Les données phénotypiques des paramètres significatifs en analyse multivariée (pourcentages de CD43, FMC7, CD38 et CD13, MFI du FMC7, CD22 et CD27) ainsi que les MFI du CD79b et CD19 ont été intégrées dans l'algorithme des forêts aléatoires (*Random Forest*). Ce modèle de classification a pour but de prédire la répartition des patients selon le diagnostic de MW ou de LZM, en fonction des marqueurs phénotypiques choisis. La matrice de confusion, indiquant les diagnostics réels et prédits par ce modèle, est présentée dans le Tableau 12.

	Diagnostics prédits	
	LZM, n	MW, n
Diagnostics posés	LZM, n	33
	MW, n	3
Taux d'erreur	15,5%	3,5%

**Tableau 12 : Matrice de confusion obtenue à partir de l'algorithme *Random Forest*.**

Ce tableau représente en ligne les diagnostics posés et en colonnes les diagnostics prédits par l'algorithme. Le taux d'erreur indique le pourcentage d'individus mal classés par le modèle pour chaque type de diagnostic.

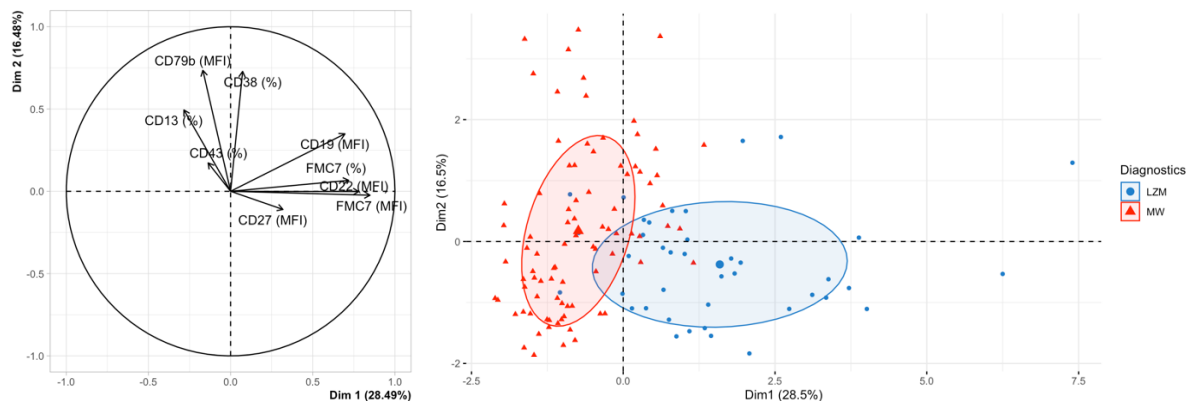
L'algorithme classe correctement 83/86 patients (97%) dans le groupe MW et 33/40 patients (83%) dans le groupe LZM. L'étude des performances de ce modèle montre que le FMC7 et l'intensité du CD22 sont les deux critères les plus importants pour distinguer la MW du LZM (Figure 33A). Ces résultats sont en accord avec les régressions logistiques présentées précédemment. L'ASC du modèle est égale à 0,957, avec une Se de 86%, une Sp de 92%, une VPP de 96% et une VPN de 75% (Figure B).



**Figure 33 : Performances du modèle prédit par l'algorithme *Random Forest*.**

A. Calcul de l'importance de chaque variable dans la prédiction du modèle, selon l'indice de Gini.  
 B. Courbe ROC des performances de la prédiction du modèle.

Une ACP des données de CMF intégrées dans l'algorithme confirme, grâce à l'éloignement des centres de gravité et des ellipses de concentration, une séparation de ces deux entités cliniques sur les marqueurs phénotypiques étudiés (Figure 34).



**Figure 34 : Profils phénotypiques de la MW (n=86) et du LZM (n=40).**

Représentation graphique d'une ACP des résultats phénotypiques (pourcentages de CD43, CD38, FMC7, CD13 et MFI du CD19, CD79b, FMC7, CD27, CD22) selon les patients. Les patients ayant une MW sont symbolisés en rouge et les patients ayant un LZM en bleu. Les deux symboles de plus grande taille représentent les centres de gravité de chaque groupe. Chaque ellipse de concentration contient 50% des individus.

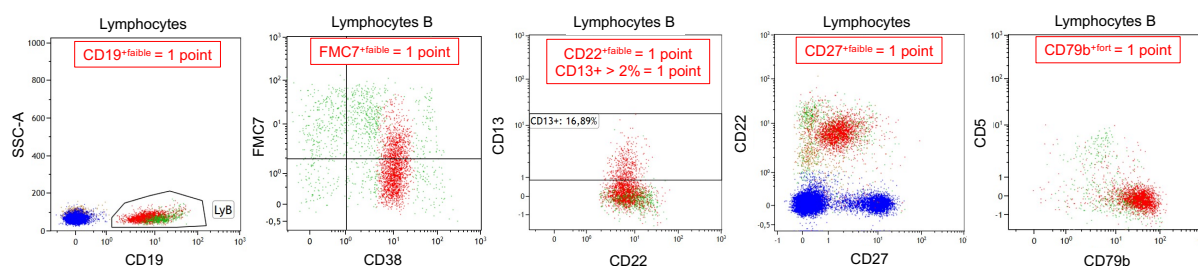
### II.2.3 Choix des marqueurs d'intérêt

Ces analyses nous ont permis de définir un score médullaire de la MW, utilisable en pratique clinique, sur la base de six paramètres (Tableau) :

	<b>0 point</b>	<b>1 point</b>
<b>Intensité du CD19</b>	Normale ou forte	Faible
<b>Intensité du FMC7</b>	Normale ou forte	Négative ou faible
<b>Intensité du CD22</b>	Normale ou forte	Faible
<b>Si CD22 faible, intensité du CD79b</b>	Faible ou normale	Forte
<b>Intensité du CD27</b>	Normal	Négative ou faible
<b>CD13 (%)</b>	< 2%	≥ 2%

**Tableau 13 : Score phénotypique médullaire de la MW sur six paramètres.**

Un exemple de patient MW ayant un score à six points sur la MO avec un profil FMC7/CD38 n°3-4 est présenté ci-dessous (Figure 35) :

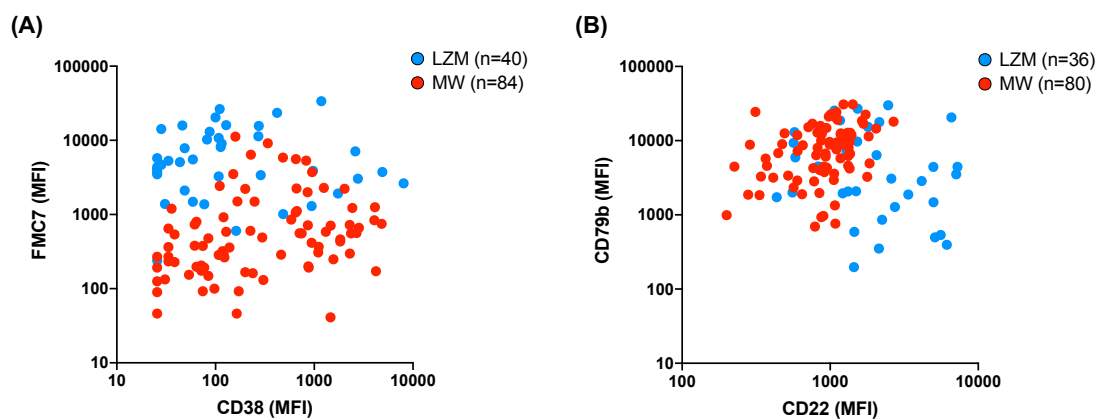


**Figure 35 : Phénotype médullaire d'un patient ayant une MW avec un score égal à six points.**

Les LyB pathologiques monotypiques  $\kappa$  sont représentés en rouge et les LyB polytypiques résiduels en vert. Les LyT sont colorés en bleu.

Malgré l'absence de significativité en analyse multivariée, l'intensité faible du CD19 sur les LyB pathologiques a été sélectionnée pour définir le score. Associée aux autres marqueurs (tels que l'intensité forte du CD79b et faible du CD22), elle est d'une grande aide pour identifier les cellules pathologiques lorsque persistent des LyB résiduels.

Les antigènes de surface FMC7 et CD22 ont été retenus pour le score, compte tenu de leur importance à distinguer la MW du LZM. Le point accordé en cas de FMC7<sup>-/+faible</sup> doit être mis en regard du profil FMC7/CD38 évoqué précédemment (Figures 26 et 36A). L'intensité du CD79b doit être regardée en cas de diminution de fluorescence du CD22. En effet, le ratio de la MFI du CD79b sur la MFI du CD22 est significativement augmenté sur les LyB pathologiques de la MW par rapport à ceux du LZM (ratio médian de 8,3 contre 1,6) ( $p < 0,0001$ ), compte tenu d'une plus forte expression du CD79b dans le groupe MW (Figure 36B).



**Figure 36 : MFI du FMC7/CD38 et CD79b/CD22 sur les LyB pathologiques.**

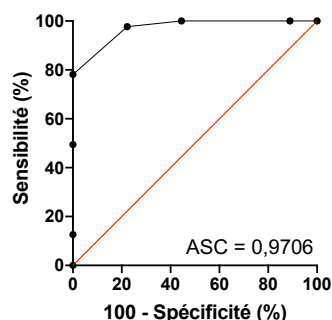
A. Représentation graphique bi-paramétrique des MFI du FMC7 et CD38 selon les groupes MW et LZM. B. Représentation des MFI du CD79b et CD22 selon les groupes MW et LZM.

Enfin, nous avons choisi d'intégrer dans le score la faible intensité d'expression du CD27 et le pourcentage de CD13 avec un seuil supérieur ou égal à 2%. Le paramètre CD43 n'a pas été retenu mais il peut être utilisé comme valeur ajoutée pour le diagnostic de MW s'il est positif.

#### II.2.4 Seuil de positivité et performances du score

Pour déterminer le seuil en faveur d'une MW, le score a été calculé dans une cohorte de prélèvements médullaires de 87 patients ayant une MW et 9 patients ayant un LZM. En faisant le choix de privilégier une bonne Se, le meilleur compromis entre Se et Sp est obtenu pour un score supérieur ou égal à 3 points (Figure 37A-B) avec une Se de 97,7%, une Sp de 77,8%, une VPP de 81,5%, une VPN de 97,1% et une ASC égale à 0,9706.

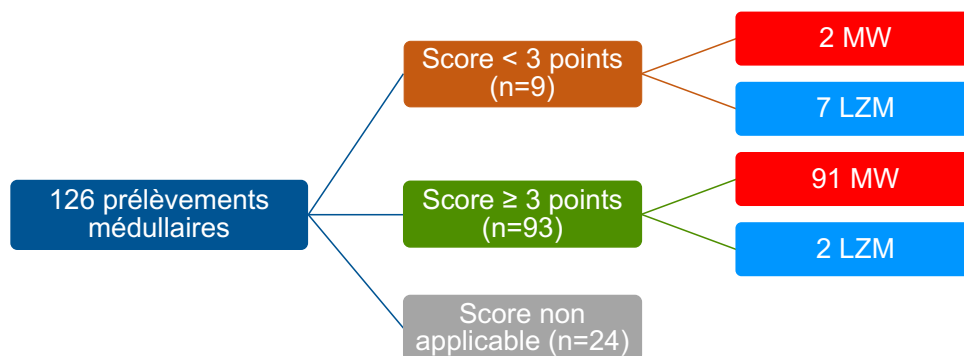
Score (points)	Sensibilité	Spécificité
0	100.0%	0.0%
1	100.0%	11.1%
2	100.0%	55.6%
3	97.7%	77.8%
4	78.2%	100.0%
5	49.4%	100.0%
6	12.6%	100.0%



**Figure 37 : Performances du score phénotypique médullaire.**

Tableau indiquant la Se et la Sp selon le nombre de points du score et courbe ROC représentant la sensibilité, 100%-spécificité et l'ASC.

Ce score a été appliqué sur les prélèvements médullaires de 126 patients (Figure 38).



**Figure 38** : Résultats de l'application du score phénotypique médullaire.

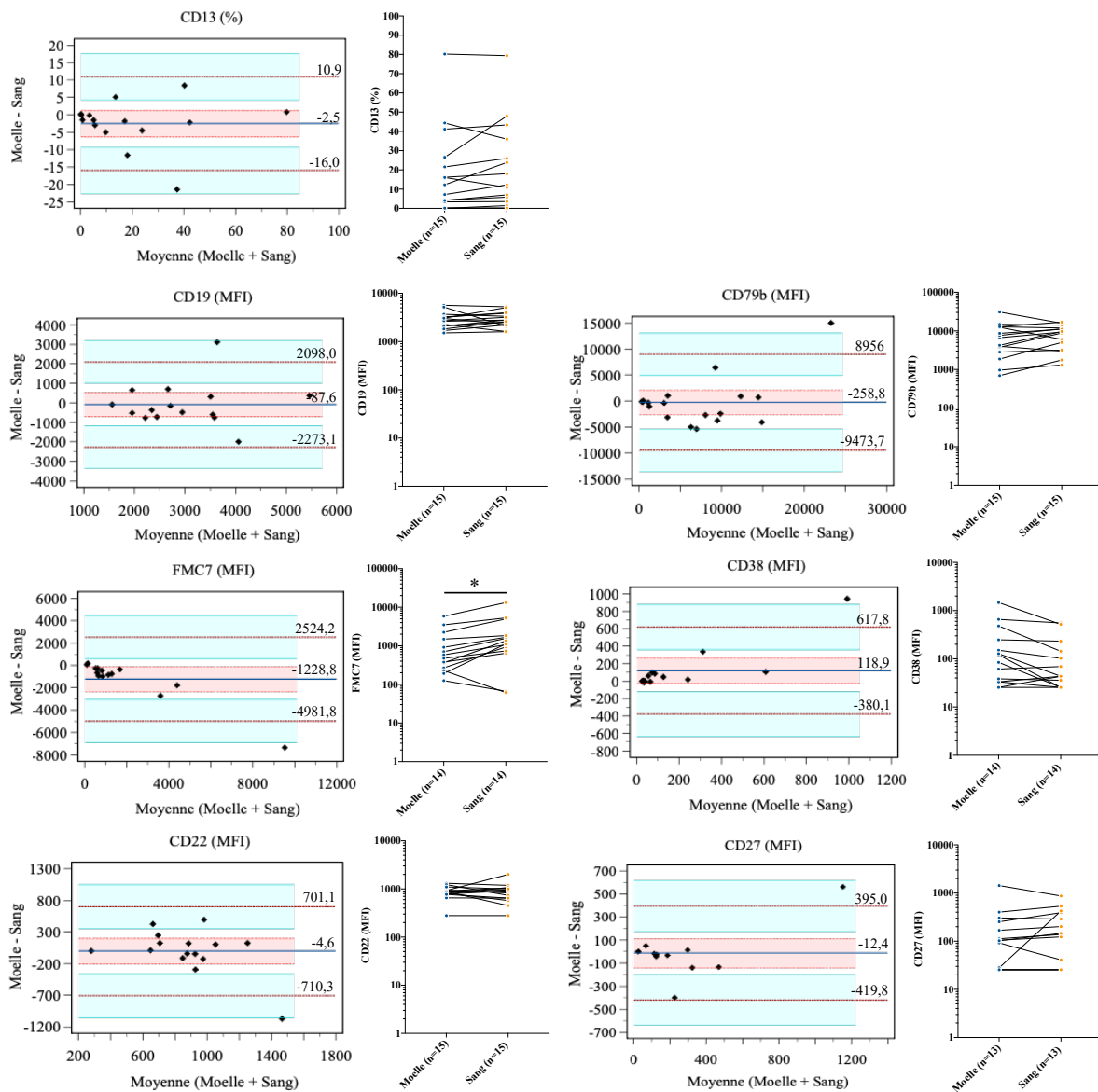
Les dossiers cliniques des deux patients ayant une MW avec un score égal à 2 points révèlent qu'au moment de la réalisation de l'immunophénotypage, les patients étaient en rechute de leur maladie après avoir reçu un traitement cytotoxique. Des modulations phénotypiques post-traitement pourraient expliquer leur score. Nous ne disposons pas du phénotypage antérieur à la mise sous traitement pour comparer les profils. Deux patients ayant un LZM présentent un score égal à 3 points, au seuil décisionnel entre les deux hémopathies. La présence du profil FMC7/CD38 n°2 est en faveur d'un LZM pour ces deux patients.

Le score n'a pu pas être appliqué à 24 immunophénotypages médullaires qui étaient ininterprétables (interférence analytique), présentaient deux clones (hémopathie biclonale ou double hémopathie) ou n'avaient pas tous les marqueurs inclus dans le score.

### **II.3. Comparaison des résultats phénotypiques médullaires et sanguins**

Avant de transposer le score médullaire à la recherche de clone circulant, nous avons comparé les immunophénotypages médullaire et sanguin de quinze patients ayant une MW avec un clone circulant. Seuls les marqueurs utilisés dans le score médullaire ainsi que la MFI du CD38 sont présentés sur la Figure 39.

Il existe une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du FMC7 à la surface des LyB entre la MO et le sang ( $p=0,0320$ ), qui s'accompagne pour certains patients d'une diminution plus modérée de l'expression du CD38. Nous n'observons pas de différence significative pour les autres paramètres inclus dans le score (Figure 39).



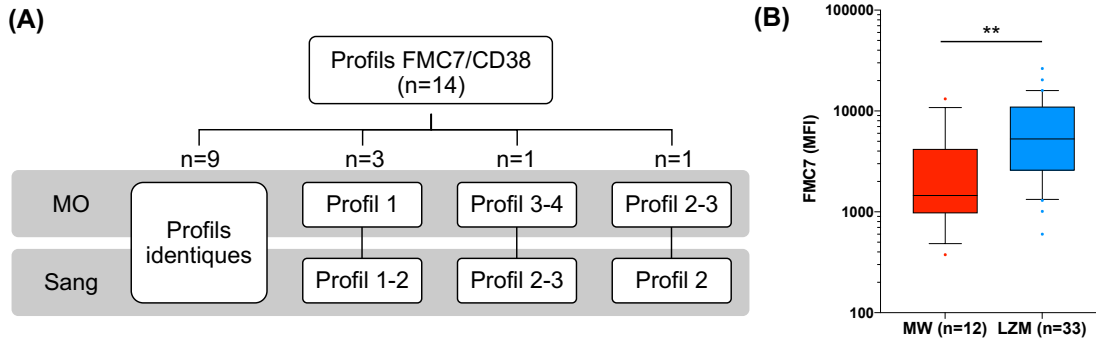
**Figure 39 : Comparaison des résultats phénotypiques médullaires et sanguins.**

Comparaison du pourcentage d'expression de CD13 et des MFI de CD19, CD79b, FMC7, CD38, CD22 et CD27 à la surface des LyB pathologiques de 15 patients ayant une MW, entre la MO et le sang. Pour chaque paramètre, le diagramme de Bland-Altman est représenté à gauche et l'évolution des résultats entre la MO et le sang à droite avec les effectifs. Sur le diagramme de Bland-Altman, la moyenne du résultat obtenu sur la MO et le sang est indiquée en abscisse et en ordonnée la différence du résultat obtenu entre la MO et le sang. Le trait bleu indique la moyenne des différences et les traits rouges en pointillés situés de part et d'autre représentent l'intervalle de confiance à 95%. \*  $p < 0,05$ .

La comparaison des profils FMC7/CD38 entre la MO et le sang montre que neuf patients ne présentent pas de modification de répartition des LyB dans le sang tandis que des variations sont observées pour cinq patients (Figure 40A). Quatre d'entre eux acquièrent un profil avec augmentation du FMC7 dans le sang et un patient présente une diminution de l'expression du CD38 (profils n°2-3 dans la MO et n°2 dans le sang).

Nous avons également comparé l'expression de FMC7 sur des prélèvements sanguins de patients ayant une MW (n=12) ou un LZM (n=33). Le pourcentage et l'intensité de fluorescence (Figure 40B) sont significativement diminués pour la MW par rapport au LZM ( $p=0,0007$  et  $p=0,0036$ , respectivement).





**Figure 40 : Expression du FMC7 dans le sang.**

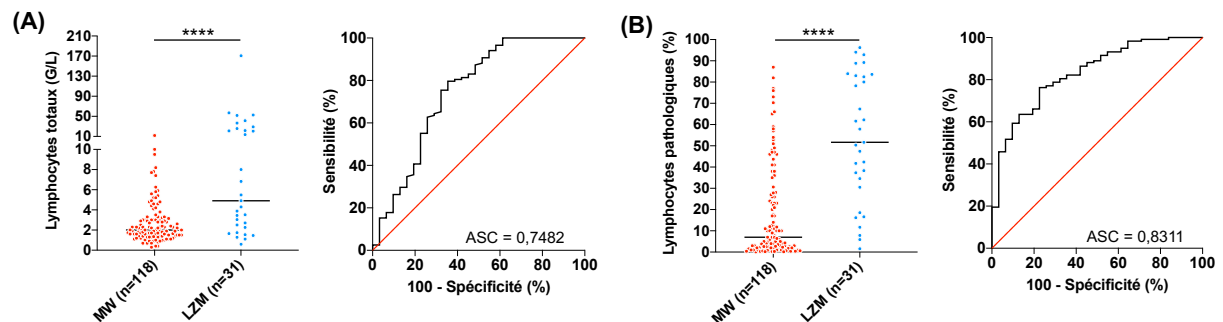
A. Comparaison du profil FMC7/CD38 entre la MO et le sang de 14 patients ayant une MW. B. MFI du FMC7 sur les LyB pathologiques circulants pour les patients ayant une MW ou un LZM avec une expression de FMC7 supérieure ou égale à 30%. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. \*\* p<0,01.

Le FMC7 reste donc un marqueur pertinent pour le score phénotypique sanguin, malgré les variations observées entre la MO et le sang. Ces résultats nous autorisent à transposer le score phénotypique médullaire aux prélèvements sanguins.

## II.4. Score phénotypique sanguin de la MW

### II.4.1 Optimisation du score pour l'étude du compartiment sanguin

Comme évoqué précédemment, les taux de Ly sanguins sur la NFS sont significativement plus bas dans la MW par rapport au LZM (Tableau 11). Nous avons comparé ces taux avec les pourcentages de LyB pathologiques circulants détectés par CMF, entre des patients ayant une MW avec un clone circulant (n=118) et des patients ayant un LZM (n=31) (Figure 41A-B).



**Figure 41 : Comparaison des taux de Ly sanguins et des pourcentages de LyB pathologiques entre la MW et le LZM.**

A. Taux de Ly totaux obtenus sur la NFS en G/L et courbe ROC évaluant la performance de ce paramètre. La médiane de chaque groupe est symbolisée par un trait noir plein. B. Pourcentages sanguins de LyB pathologiques dans les Ly totaux, obtenus par CMF et courbe ROC évaluant la performance de ce paramètre. \*\*\*\* p<0,0001.

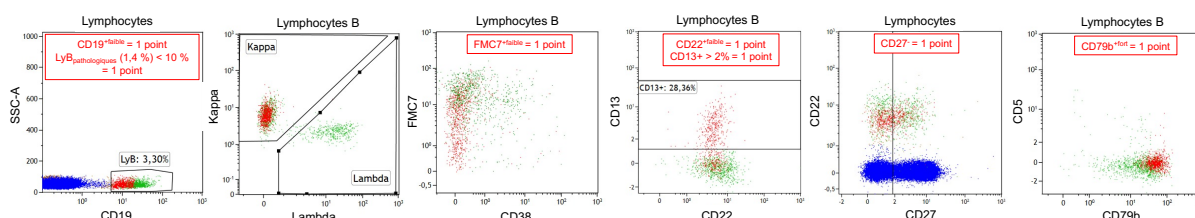
Le pourcentage des LyB pathologiques estimé par CMF parmi les Ly circulants apparaît plus efficace que le taux de Ly sanguins, pour différencier la MW du LZM, même si l'ASC n'est que de 0,8311. Le pourcentage médian de LyB pathologiques est de 7% pour les patients ayant un clone circulant de MW contre 52% pour le LZM (p<0,0001).

Nous avons ainsi fait le choix de rajouter le pourcentage de LyB pathologiques comme critère supplémentaire pour l'application du score MW au compartiment sanguin (Tableau 14). Le seuil de 10% a été choisi pour faciliter son utilisation.

	<b>0 point</b>	<b>1 point</b>
<b>Lymphocytes pathologiques (%)</b>	≥ 10%	< 10%
<b>Intensité du CD19</b>	Normale ou forte	Faible
<b>Intensité du FMC7</b>	Normale ou forte	Négative ou faible
<b>Intensité du CD22</b>	Normale ou forte	Faible
<b>Si CD22 faible, intensité du CD79b</b>	Faible ou normale	Forte
<b>Intensité du CD27</b>	Normal	Négative ou faible
<b>CD13 (%)</b>	< 2%	≥ 2%

**Tableau 14** : Score phénotypique sanguin défini sur sept paramètres.

Un exemple de patient MW ayant un score à sept points sur le sang avec un profil FMC7/CD38 n°1-2 est présenté ci-dessous (Figure 42) :



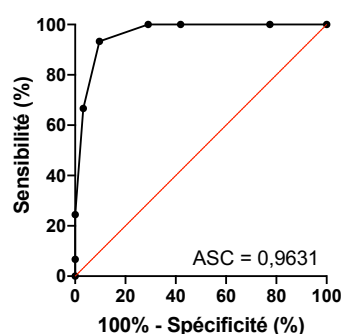
**Figure 42** : Phénotype sanguin d'un patient atteint d'une MW avec un score à sept points.

Les LyB pathologiques monotypiques  $\kappa$  sont représentés en rouge et les LyB polytypiques résiduels en vert. Les LyT sont colorés en bleu.

#### II.4.2 Seuil de positivité et performances du score sanguin

Ce nouveau score a été calculé dans une cohorte de prélèvements sanguins composée de 45 patients ayant un clone circulant de MW et 31 patients ayant un LZM. Le meilleur compromis entre Se et Sp, mis en évidence par la courbe ROC, est obtenu pour un score supérieur ou égal à 4 points dans le sang (Figure 43). Pour ce seuil, la Se est de 93,3%, la Sp de 90,3%, la VPP de 90,6%, la VPN de 93,0% avec une ASC égale à 0,9631.

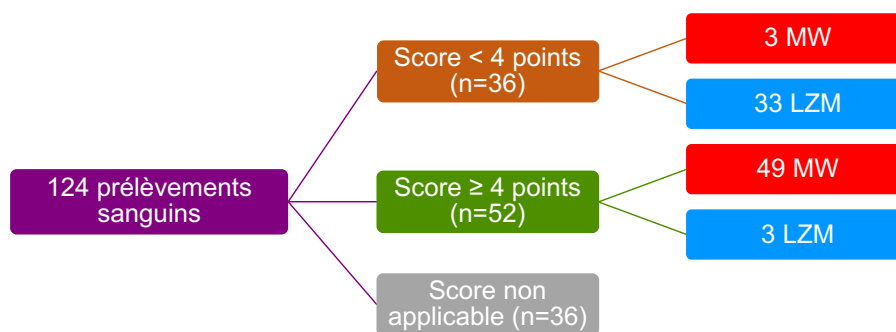
<b>Score (points)</b>	<b>Sensibilité</b>	<b>Spécificité</b>
0	100.0%	0.0%
1	100.0%	22.6%
2	100.0%	58.1%
3	100.0%	71.0%
4	93.3%	90.3%
5	66.7%	96.8%
6	24.4%	100.0%
7	6.7%	100.0%



**Figure 43** : Performances du score phénotypique sanguin.

Tableau indiquant la Se et la Sp selon le nombre de points du score et courbe ROC représentant la sensibilité, 100%-spécificité et l'ASC.

Ce score a été mis en pratique sur les prélèvements sanguins de 124 patients (Figure 44).



**Figure 44** : Résultats de l'application du score phénotypique sanguin.

Comme proposé, nous avons étudié le profil FMC7/CD38 pour les trois patients étiquetés MW avec un score inférieur strictement à 4 (3 points chacun) : deux d'entre eux ont un profil 1-2 en faveur d'une MW sans pouvoir exclure un LZM, tandis que le troisième a un profil n°2. La reprise de son dossier clinique révèle une forme frontière entre une MW et un LZM avec un résultat de BOM en faveur d'un LZM. Trois patients étiquetés LZM ont un score supérieur ou égal à 4 (un patient avec un score à 4 points et les deux autres avec un score à 5 points). Deux d'entre eux présentent le profil FMC7/CD38 n°2 avec une forte intensité du FMC7, en faveur d'un LZM. Le troisième présente un profil 1-2 avec la présence de la mutation *MYD88*, pouvant faire évoquer une forme frontière entre une MW et un LZM.

Le score n'a pu pas être appliqué à 36 immunophénotypages sanguins qui étaient ininterprétables (interférence analytique), présentaient deux clones (hémopathie biclonale ou double hémopathie), avaient un clone en trop faible quantité pour être isolé sur tous les marqueurs ou n'avaient pas tous les marqueurs inclus dans le score.

#### II.4.3 Prévalence des clones sanguins

Dans une cohorte de 187 patients ayant une MW, 73% des patients (n=136) présentent un clone circulant. La prévalence de la détection des clones sanguins au laboratoire a progressivement augmenté avec les années, passant de 65% pour les prélèvements réalisés avant 2015 à 86% pour ceux réalisés entre septembre 2015 et septembre 2020. Cette amélioration après 2015 est liée notamment à la présence dans le même tube d'analyse n°5 des anticorps anti-CD19, anti-κ, anti-λ, anti-CD22, anti-CD13 et anti-CD27.

## II.5. Application du score phénotypique

### II.5.1 Autres SLP-B avec un score de Matutes $\leq 3$

Le nouveau score, adapté au compartiment médullaire et sanguin, a été appliqué aux patients avec un score de Matutes  $\leq 3$  dans les trois autres groupes de SLP-B précédemment étudiés.

		LLC atypique (n=3)	LF (n=9)	LCM (n=7)
MO, n	Score < 3	1	0	0
	Score $\geq 3$	0	0	2
Sang, n	Score < 4	2	3	5
	Score $\geq 4$	0	6	0

**Tableau 15 : Résultat du score phénotypique pour les SLP-B avec un score de Matutes  $\leq 3$ .**

Sur ce très petit échantillonnage de patients, nous observons que les patients ayant un LCM et surtout ceux ayant un LF présentent un phénotype très proche de la MW sur les paramètres sélectionnés dans le score (Tableau 15). Ce dernier a été construit pour aider à distinguer la MW du LZM et n'est pas recommandé pour discriminer la MW des autres entités cliniques pour lesquelles la concertation pluridisciplinaire (cytologie, CMF avec recherche de l'antigène CD10, cytogénétique et biologie moléculaire) permet de poser le diagnostic.

### II.5.2 Formes frontières entre MW et LZM

Certains patients présentent des entités cliniques et biologiques à la frontière entre une MW et un LZM. Le score a été calculé chez sept patients ayant eu un immunophénotypage sanguin et dont le diagnostic de forme frontière a été posé. Les résultats révèlent que seul un patient présente un score à 3 points qui n'est pas en faveur d'une MW tandis que six autres présentent un score supérieur ou égal à 4 points en faveur d'une MW (trois patients ont un score à 4 points, deux patients à 5 points et un patient à 6 points).

### II.5.3 GMSI à IgM

Nous nous sommes intéressés aux résultats des immunophénotypages d'une cohorte de patients ayant une GMSI à IgM avec (n=23) ou sans (n=72) neuropathie anti-MAG associée (Tableau 16). Parmi ces patients, 49% (n=47) présentent une population lymphocytaire B pathologique. Le score n'a pu être calculé que pour 31 patients, les seize autres ayant un clone en trop faible quantité pour permettre une détermination fiable de l'ensemble des points, un clone MBL (score de Matutes  $\geq 4$ ) ou une double hémopathie.

	GMSI à IgM (n=72)		GMSI à IgM et neuropathie anti-MAG (n=23)	
	MO (n=13)	Sang (n=59)	MO (n=13)	Sang (n=10)
<b>Age (années), médiane (min-max)</b>	68 (35-94)		68 (40-85)	
<b>Ratio hommes/femmes</b>	42 / 30		13 / 10	
<b>Immunochimie</b>				
<b>IgMκ, n ; pic médian (g/L)</b>	50 ; 3,2		16 ; non intégrable	
<b>IgMλ, n ; pic médian (g/L)</b>	16 ; 3,8		6 ; 4,8	
<b>IgM double, n</b>	2		0	
<b>Absence de pic</b>	4*		1*	
<b>Immunophénotypage</b>				
<b>Absence d'anomalie phénotypique</b>	4	32	5	7
<b>Population pathologique</b>	<b>Score positif, n</b>	6	14	5
	<b>Score négatif, n</b>	0	3	0
<b>Autres : clone trop minoritaire / MBL / double hémopathie</b>	0 / 3 / 0	4 / 3 / 3	2 / 0 / 1	0 / 0 / 0

**Tableau 16 : Résultats immunochimiques et phénotypiques d'une cohorte de GMSI à IgM avec ou sans neuropathie anti-MAG.**

Un score MW est positif quand il est  $\geq 3$  dans la MO ou  $\geq 4$  dans le sang, et négatif quand il est  $< 3$  dans la MO ou  $< 4$  dans le sang. \* patients adressés en consultation pour suivi d'un pic monoclonal mais pic non identifiable à l'EPS au moment de la réalisation de l'immunophénotypage.

L'application de ce score permet de suspecter une évolution vers une MW pour 87% (n=20) des patients ayant une GMSI à IgM évaluable et 100% (n=8) des patients ayant une neuropathie anti-MAG associée à une GMSI à IgM évaluable (Tableau 16).

### **III. CORRELATIONS CLINICO-BIO-PHENOTYPIQUES DANS LA MW**

#### **III.1. Paramètres corrélés avec l'infiltration médullaire**

Pour répondre au dernier objectif de notre étude, les résultats de l'immunophénotypage médullaire des 86 patients ayant une MW ont été confrontés aux différentes données clinico-biologiques détaillées dans la partie Patients et Méthodes.

Comme attendu, l'infiltration médullaire par CMF est corrélée au taux du pic IgM ( $p=0,0129$ ). Les patients ayant une restriction isotypique totale des LyB (sans persistance de LyB résiduels polytypiques) ont tendance à développer des adénopathies ( $p=0,0280$ ). L'infiltration pathologique médullaire est significativement augmentée avec un pourcentage médian de LyB pathologiques dans les leucocytes à 7% dans le groupe avec LyB résiduels (n=57) contre 21% dans le groupe sans LyB résiduel (n=29) ( $p<0,0001$ ). L'infiltration médullaire ne prédit pas la présence d'un clone circulant mais, lorsqu'un clone est détecté, elle est corrélée au pourcentage de ce clone ( $p=0,0145$ ). Les patients avec une infiltration tumorale augmentée sont davantage traités (médiane de LyB pathologiques égale à 12% dans le groupe des patients traités (n=47) contre 3% dans le groupe des patients non traités (n=17),  $p=0,0070$ ).

### **III.2. Paramètres corrélés avec les marqueurs phénotypiques : importance du CD38**

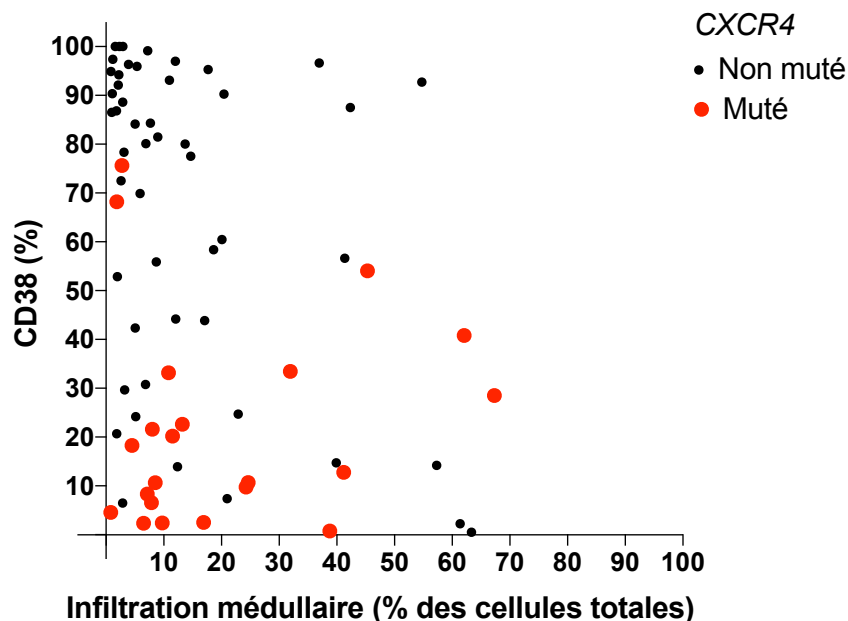
Peu d'associations significatives ressortent entre les marqueurs phénotypiques et les données clinico-biologiques. Il ne semble pas exister de corrélation entre une expression phénotypique et la présence d'une hyperviscosité, d'adénopathies, d'une splénomégalie, d'un taux élevé de LDH ou de  $\beta$ 2-microglobuline et d'une anomalie cytogénétique (dont la del6q). Le faible effectif de patients non mutés pour *MYD88* (n=3) ne permet pas de faire une comparaison statistique. La mutation *ARID1A*, présente chez six patients, ne permet aucune corrélation fiable. Toutefois, elle serait associée à une expression augmentée du CD23.

Aucun marqueur ou profil de marqueurs n'est prédictif de la réponse au traitement, du nombre de lignes de traitement, du score pronostic ISSWM et de la survie globale et survie sans progression (Annexe 5).

Les corrélations les plus significatives concernent le **pourcentage de CD38** présent à la surface du clone médullaire Waldenström :

- la diminution du taux de plaquettes est corrélée à la diminution du CD38 ( $p=0,0099$ ).
- l'infiltration médullaire est inversement corrélée avec le CD38 ( $p=0,0007$ ) (Figure 45).
- la présence d'une mutation du gène *CXCR4* (22 patients sur 74) est associée à une diminution significative du CD38 ( $p<0,0001$ ) (Figure 45).
- lorsqu'un clone circulant est mis en évidence, son pourcentage dans les Ly est inversement corrélé avec le CD38 ( $p=0,0009$ ), pour les 43/56 patients ayant eu un phénotypage sanguin révélant la présence d'un clone.
- l'instauration d'un traitement est corrélé à la diminution du CD38 : les patients ayant un plus faible pourcentage de CD38 sont plus souvent traités, avec une médiane d'expression égale à 37% dans le groupe des patients traités (n=46) contre 78% dans le groupe ne recevant pas de traitement (n=17) ( $p=0,0286$ ).

Aucun marqueur ou profil phénotypique médullaire de la MW n'apparaît associé à la présence ou l'absence de clone circulant. Il n'existe pas d'association entre le statut mutationnel du gène *CXCR4* et l'infiltration médullaire ni la présence d'un clone circulant et son pourcentage lorsqu'il est présent. Aucune corrélation n'est retrouvée entre la présence ou non de LyB résiduels dans la MO et le pourcentage médullaire de CD38.



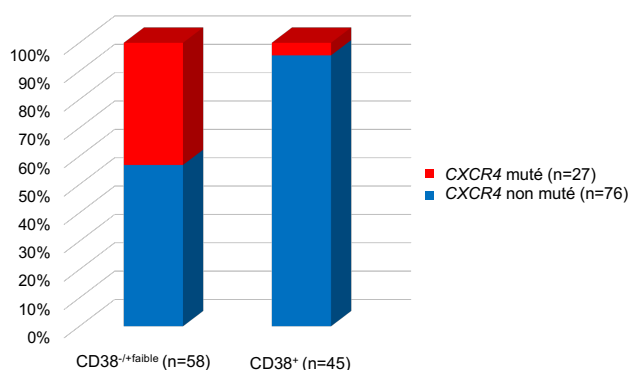
**Figure 45 : Expression du CD38 en fonction de l'infiltration médullaire par les LyB pathologiques et du statut mutationnel de CXCR4 (n=74).**

Les patients mutés pour le gène *CXCR4* ont un point rouge de plus grand diamètre que les patients non mutés en noir.

Afin de documenter un éventuel rôle du CD38 sur une plus grande cohorte, nous avons déterminé le profil phénotypique FMC7/CD38 sur 137 immunophénotypages réalisés entre 2009 et 2021 (84 patients ont déjà été étudiés précédemment avec le pourcentage de CD38). Deux groupes d'expression du CD38 ont été formés sur la base du profil FMC7/CD38, en excluant les profils hétérogènes :

- CD38<sup>-/+faible</sup> (n=73) : profils 1, 1-2, 1-4, 2 et 2-3 (majorité de LyB pathologiques dans le quadrant 2)
- CD38<sup>+</sup> (n=53) : profils 2-3 (majorité de LyB pathologiques dans le quadrant 3), 3, 3-4 et 4.

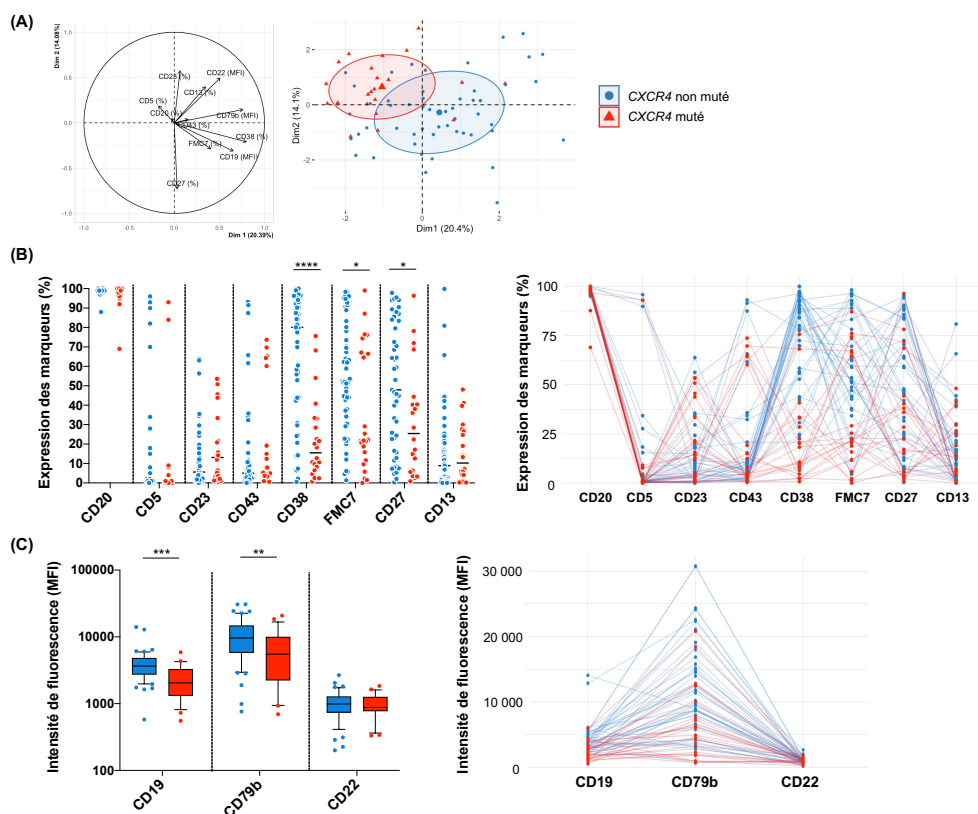
Cette approche, moins précise que le pourcentage de CD38, confirme sur une plus grande cohorte les observations faites précédemment : l'absence ou la faible expression de CD38 reste corrélée à un taux de plaquettes plus faible ( $p=0,0007$ ), une infiltration médullaire en cytologie augmentée ( $p=0,0355$ ), la présence d'une mutation du gène *CXCR4* ( $p<0,0001$ , Figure 46), une tendance à recevoir un traitement dès le diagnostic de MW ( $p=0,0476$ ) et est inversement corrélée au pourcentage de clone circulant ( $p=0,0005$ ).



**Figure 46 : Expression du CD38 selon la présence ou non d'une mutation de CXCR4.**

### III.3. Profil phénotypique spécifique des mutations de *CXCR4*

Enfin, devant les résultats obtenus entre le statut mutationnel de *CXCR4* et l'expression médullaire du CD38 des patients ayant une MW, nous nous sommes focalisés sur les résultats des immunophénotypages médullaires des 74 patients de notre cohorte de réanalyse, pour lesquels la recherche de mutation *CXCR4* a été effectuée (Annexe 6). Parmi eux, 30% (n=22) sont mutés pour ce gène avec un chiffre de plaquettes diminué ( $p=0,0008$ ) et un taux plus important d'IgM monoclonale (pic médian égal à 21,9 g/L contre 8,6 g/L dans le groupe non muté) ( $p=0,0006$ ). Une ACP des marqueurs phénotypiques met en évidence une séparation des profils phénotypiques selon le statut mutationnel *CXCR4* (Figure 47A). Comme attendu, les LyB mutés pour le gène *CXCR4* ont une expression significativement plus faible voire négative du CD38 à leur surface (médiane égale à 16% pour le groupe muté contre 80% pour le groupe non muté,  $p<0,0001$ ). Le CD38 reste statistiquement significatif en analyse multivariée ( $p=0,0040$ ). Les pourcentages de FMC7 ( $p=0,0257$ ) et CD27 ( $p=0,0280$ ) ainsi que les MFI de CD19 ( $p=0,0002$ ) et CD79b ( $p=0,0076$ ) à la surface des LyB pathologiques sont significativement diminués pour les patients mutés (Figure 47B-C, Annexe 6). La quantité de plasmocytes estimés est également plus faible dans le groupe muté.



**Figure 47 : Etude phénotypique selon le statut mutationnel de *CXCR4*.**

A. ACP des résultats d'immunophénotypage médullaire de 74 patients ayant une MW en fonction des variables phénotypiques symbolisées par les vecteurs. Les patients *CXCR4* mutés sont symbolisés par un triangle rouge et ceux *CXCR4* non mutés par un rond bleu. Les deux symboles de plus grande taille représentent les centres de gravité pour chaque groupe. Chaque ellipse de concentration contient 50% des individus. B-C. Expression en pourcentages et MFI des marqueurs phénotypiques selon les patients non mutés (bleu) et mutés (rouge) pour *CXCR4*. Chaque ligne correspond aux résultats d'un patient. La médiane est symbolisée par un trait noir. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IIQ et le 10<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> percentiles. \*  $p<0,05$  ; \*\*  $p<0,01$  ; \*\*\*  $p<0,001$  ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ .



## **DISCUSSION**

La Macroglobulinémie de Waldenström est une hémopathie rare, pouvant se présenter sous des formes cliniques très variées, ce qui rend son diagnostic parfois difficile, notamment avec des entités proches comme le lymphome de la zone marginale. Grâce à l'expertise des services d'Hématologie clinique et biologique de l'hôpital Pitié-Salpêtrière, nous avons eu accès aux données biologiques et cliniques de nombreux patients.

### **Le premier objectif de ce travail était de caractériser le profil phénotypique exprimé par les cellules tumorales de la MW.**

Les données obtenues au laboratoire avant 2015 montrent que les LyB pathologiques de la MW expriment tous les marqueurs pan-cellulaires B CD19, CD20, CD79b, CD22, avec une restriction isotypique pour la chaîne légère de surface. Ils expriment pour la majorité l'IgM et l'IgD de surface, sont souvent négatifs pour les antigènes CD5, CD23, CD43, CD10, CD11c et n'expriment jamais le CD103. Les expressions de FMC7, CD38, CD27 et CD1c à la surface des LyB apparaissent très hétérogènes entre les patients. Ces résultats sont en accord avec les études précédemment publiées sur le phénotypage des cellules de la MW (84,85,87,88,96).

En 2015, le laboratoire a modifié les marqueurs évalués dans cette hémopathie en ciblant quinze antigènes dont le marqueur CD13. La MW étant une maladie médullaire, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la cellule tumorale dans la MO.

Face à l'évolution des logiciels d'analyse de CMF, nous avons étudié différentes stratégies de réanalyse de ces données rétrospectives. Le logiciel FACSDiva™ (BD Biosciences), utilisé en routine dans notre laboratoire, ne nous a pas semblé approprié pour une réanalyse groupée. Nous avons ainsi choisi le logiciel Kaluza (Beckman Coulter) pour réanalyser et interpréter les immunophénotypages présentés dans cette étude. En complément, une partie des données a été incrémentée dans le logiciel d'analyse non supervisée Omiq.

Les immunophénotypages que nous avons réanalysés, étaient répartis sur plusieurs années, nous nous sommes donc interrogés sur la pertinence de comparer ces données en l'absence de standardisation stricte au laboratoire. En effet, la réalisation quotidienne de contrôles (passage et application des réglages liés aux billes CST et contrôles qualité), préconisée par notre fournisseur (BD Biosciences), permet de garantir la reproductibilité des intensités de fluorescence, mais de petites variations peuvent se produire sur de longues périodes d'analyse. Une ACP, réalisée sur le pourcentage de positivité et l'intensité de fluorescence des marqueurs les moins variables sur les LyB pathologiques de MW, indique l'absence de modifications majeures liées au facteur temps, rendant exploitable la comparaison des résultats d'immunophénotypages entre eux.

Les intensités de fluorescence étant des paramètres plus sensibles que l'étude des pourcentages de positivité, nous les avons évaluées en calculant des RFI (avec comme dénominateur les LyT de chaque patient) afin de réduire l'impact d'une éventuelle variabilité. L'utilisation des RFI a cependant l'inconvénient de pouvoir induire des variations aberrantes pour de faibles variations de MFI de la population référente négative. L'interprétation des résultats d'expression de fluorescence étant similaire avec les MFI et les RFI, nous avons donc privilégié les résultats en MFI. La réalisation de RFI sur les LyB résiduels serait à privilégier pour l'avenir avec des acquisitions de données plus longues sur les cytomètres, pour optimiser la mise en évidence de LyB résiduels.

La réanalyse fine de prélèvements médullaires de MW a ainsi permis de confirmer les observations faites sur les prélèvements antérieurs à 2015, d'évaluer l'expression du marqueur myéloïde CD13 et d'apporter des précisions sur les intensités d'expression de certains antigènes en comparaison : (i) à un groupe contrôle sans hémopathie, (ii) aux LyB résiduels de chaque patient et (iii) à d'autres SLP-B proches (comme le LZM) ou pour lesquels le diagnostic différentiel se posait avec une MW (incluant des LLC atypiques, LCM et LF). Ainsi, les LyB pathologiques de la MW se caractérisent par une plus faible expression du CD19 et du CD20 et une forte expression des chaînes légères monotypiques et du CD79b. Nous avons privilégié l'étude de ce co-récepteur comme approche de l'expression du BCR, son expression étant moins variable que celle des chaînes légères. Le ratio  $\kappa:\lambda$  met en évidence une prédominance de la chaîne légère  $\kappa$  (5:1) dans notre cohorte, en accord avec les études publiées (84,86).

Les profils phénotypiques sont assez similaires entre les patients, sauf pour les expressions du FMC7 et du CD38 qui peuvent être très différentes d'un patient à l'autre. Ceci nous a conduit à décrire neuf profils FMC7/CD38 sur une représentation bi-paramétrique. Les profils les plus souvent retrouvés correspondent à une faible intensité du FMC7 et du CD38 pour un tiers des patients (profils 1, 1-2 et 1-4). Très peu de corrélations sont retrouvées entre les marqueurs exprimés à la surface des LyB pathologiques, hormis une corrélation significative entre le FMC7 et le CD38. Conformément à la littérature, les LyB du clone Waldenström expriment faiblement les antigènes CD22 et CD27 (84,87). En appliquant le seuil de positivité de 2% pour le CD13 (90), nous observons que ce marqueur est exprimé à la surface des LyB pathologiques chez deux tiers des patients ayant une MW. Décrit comme un marqueur de différenciation plasmocytaire, aucune corrélation n'a toutefois été mise en évidence avec le pourcentage de CD38 ou de plasmocytes estimés. Le panel utilisé en routine pour la MW n'étant pas conçu pour évaluer la plasmocytose médullaire, nous avons estimé le pourcentage de plasmocytes sur la forte expression du CD38. Nous trouvons une plasmocytose en faible quantité, similaire à celle rapportée sur une cohorte de patients ayant une MW en 2014 (87). Cette approche avec moins d'événements acquis qu'une recherche standard de plasmocytes, ne nous permet pas d'évaluer le phénotype et la restriction isotypique de ces cellules.

Une récente publication de l'équipe de Limoges confirme la présence d'un *continuum* de différenciation entre les LyB pathologiques et les plasmocytes sur l'expression du CD138, qui, associée au taux de pic IgM et à la présence de la mutation du gène *MYD88*, oriente vers le diagnostic de MW (100). Cependant, en dehors d'une restriction isotypique, les plasmocytes ne présentent pas d'anomalies phénotypiques particulières, contrairement aux plasmocytes myélomateux (87), ce qui limite l'intérêt de leur phénotypage en routine clinique. Un temps réalisé au laboratoire, l'évaluation du contingent plasmocytaire pourrait être de nouveau envisagée, notamment pour leur quantification précise.

Décrite comme une caractéristique phénotypique de la cellule tumorale de la MW (15), l'association CD25<sup>+</sup>/CD22<sup>+faible</sup> n'a pas pu être évaluée sur les réanalyses faites après 2015, par manque de réactivité de l'anticorps anti-CD25 utilisé. En effet, nous mettons en évidence une réactivité variable de cinq anticorps anti-CD25 (deux clones différents) couplés à différents fluorochromes, qui semble davantage liée au fluorochrome utilisé qu'au clone. Une récente étude, ayant utilisée le même anticorps anti-CD25 que celui du laboratoire après 2015, rapporte l'absence d'expression de ce marqueur dans la MW (100). Une vigilance toute particulière doit donc être portée sur le choix du couple anticorps/fluorochrome pour la détection de l'expression du CD25, notamment pour les choix d'associations en multifuorescence. La réanalyse de ce marqueur sur quelques immunophénotypages antérieurs à 2015 avec un anticorps anti-CD25 fonctionnel montre la pertinence de cet antigène, plus fréquemment exprimé à la surface des LyB pathologiques de MW que ceux du LZM. Cependant, contrairement à l'étude publiée par Ocio et coll., nous n'avons pas observé de différence d'intensité de fluorescence entre ces deux hémopathies (86), possiblement en lien avec les anticorps anti-CD25 utilisés dans ces deux études.

Les immunophénotypages des quelques SLP-B réanalysés sont conformes aux données de la littérature et ont permis de souligner certaines différences avec la MW. Comme attendu, la MW se différencie significativement de la LLC par l'absence d'expression du CD5, CD23 et CD43 dans la majorité des cas et par une intensité de fluorescence plus forte du CD79b. Les différences significatives avec le LCM concernent notamment le CD5, CD38 et FMC7, souvent très positifs dans le LCM. A la différence des deux précédents SLP-B, la MW présente un profil phénotypique proche du LF, avec toutefois un CD19 plus faiblement exprimé et une expression augmentée du FMC7 dans le LF. L'expression du CD10 n'a pas pu être évaluée dans notre étude, ce marqueur n'étant pas systématiquement recherché en cas de suspicion de MW. Compris entre 0 et 3, le score de Matutes n'est pas un critère suffisant pour distinguer la MW des autres SLP-B, hormis la LLC (97). De plus, compte tenu des faibles effectifs dans notre étude, aucun patient avec un SLP-B, autre qu'une MW et un LZM, n'exprime le CD13, contrairement aux données rapportant une expression du CD13 dans certains SLP-B (90). Aucune association entre l'expression du CD13 et du FMC7 n'est retrouvée dans le groupe MW, contrairement à celle observée dans la LLC (93).

Le LZM reste le diagnostic différentiel le plus difficile à poser avec la MW. Une attention particulière a été portée sur les phénotypes exprimés par ces deux lymphomes à différenciation lymphoplasmocytaire. Plusieurs marqueurs étudiés au laboratoire se distinguent par leur expression phénotypique, les plus significatifs étant l'augmentation du FMC7, CD27 et CD22 et la positivité plus faible du CD13 dans le LZM. Par conséquent, les patients du groupe LZM présentent majoritairement un profil n°2 sur une représentation bi-paramétrique FMC7/CD38 (forte expression du FMC7 et absence d'expression du CD38), qui n'est presque pas retrouvé chez les patients atteints de MW. Nos résultats sont en accord avec les données publiées en 2005, pour les antigènes FMC7, CD22 et CD23, sur une cohorte de 85 patients ayant une MW et 29 patients ayant un LZM (86). Cependant, contrairement aux résultats de cette étude, les expressions des antigènes CD5 et CD38 et les intensités de CD19 et CD20 sont significativement différentes entre nos deux groupes. Le ratio des chaînes légères  $\kappa:\lambda$  observé dans le groupe LZM (4:1) diffère de celui publié par cette équipe (1:1) et est semblable aux données obtenues par immunohistochimie (106,118). Enfin, aucune variation significative sur la plasmocytose médullaire n'a été mise en évidence entre les patients atteints de MW et ceux atteints de LZM, sous réserve d'un faible nombre de MO évaluées pour les patients ayant un LZM. Les résultats obtenus en analyse non supervisée des données phénotypiques de patients ayant une MW ou un LZM confirment, grâce à l'intelligence artificielle, les observations faites précédemment. Utile et rapide pour les données multiparamétriques de cytométrie, l'analyse non supervisée requiert toutefois une homogénéité et une reproductibilité parfaite entre les échantillons. Elle permet donc dans notre étude de confirmer les observations mais ne peut pas être utilisée pour comparer précisément les échantillons et isoler des sous-populations lymphocytaires B propres à l'une ou l'autre des hémopathies, sur de telles données rétrospectives.

**Le deuxième objectif de notre travail était d'élaborer un score phénotypique de la MW, applicable aussi bien dans la MO que dans le sang**, pour d'une part écarter un LZM, notamment dans les formes frontières difficiles à diagnostiquer, et d'autre part, isoler les clones Waldenström minoritaires circulants au sein des LyB polytypiques. Les marqueurs significativement différents en analyse univariée entre la MW et le LZM ont été évalués dans un modèle de régression logistique multivariée. La diminution du pourcentage de FMC7 et l'augmentation du CD43, CD38 et CD13 ainsi que les faibles intensités du FMC7, CD22 et CD27 sont en faveur d'un diagnostic de MW. Ces résultats ont ensuite été confortés par un algorithme de prédiction indiquant que les variables ayant le plus d'importance pour distinguer ces deux entités cliniques sont le FMC7 et l'intensité du CD22. Les différentes méthodes d'analyse utilisées (comparaisons univariées, multivariées et analyses non supervisées par t-SNE, ACP et modèle de prédiction du diagnostic) aboutissent toutes aux mêmes conclusions, avec un profil phénotypique médullaire de la MW distinct du LZM.

Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Paiva et coll. utilisant 17 marqueurs antigéniques, mais sur un très faible effectif de patients ayant un LZM (15).

Nos résultats nous permettent ainsi de proposer un score phénotypique médullaire en faveur d'une MW fondé sur six points avec un point attribué en cas d'intensité faible du CD19, du FMC7, du CD22, du CD27 et de pourcentage de CD13 supérieur ou égal à 2%. En cas de faible expression du CD22 à la surface des LyB pathologiques, un point supplémentaire est accordé sur l'expression forte du CD79b. Le profil FMC7/CD38 a également tout son intérêt, en complément de l'expression du CD43, pour conforter le diagnostic phénotypique en faveur ou non d'une MW.

Un score médullaire supérieur ou égale à 3 points est en faveur d'une MW avec le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité (97,7% et 77,8% respectivement). Deux patients étiquetés MW ont un score à 2 points. Leur immunophénotypage a été réalisé à la rechute de la maladie, après traitement par chimiothérapie, potentielle cause de modulations phénotypiques. Deux patients diagnostiqués LZM sont à l'inverse classés en MW (score à 3 points). Nous nous sommes ensuite assurés de l'absence de modulation phénotypique significative de la cellule tumorale Waldenström entre la MO et son passage dans le sang, avant d'appliquer le score phénotypique à la recherche de clone circulant. Seule l'expression du FMC7 était significativement augmentée et celle du CD38 plus faible, dans le sang par rapport à la MO. Toutefois, l'apport du FMC7 reste pertinent pour le score sanguin puisque son intensité d'expression reste significativement diminuée sur les clones circulants de MW par rapport à ceux de LZM. En complément des six paramètres évalués dans le score médullaire, le pourcentage de LyB pathologiques parmi les Ly totaux (inférieur à 10%) a été ajouté dans la définition du score phénotypique sanguin. Un score supérieur ou égal à 4 permet de départager la MW du LZM, avec le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité (93,3% et 90,3% respectivement). L'application du score révèle trois faux négatifs (trois patients étiquetés MW avec un score à 3 points en faveur d'un LZM) et trois faux positifs (trois patients suivis pour un LZM avec un score à 4 ou 5 points, en faveur d'une MW). Dans ces cas délicats, l'apport de la représentation bi-paramétrique FMC7/CD38 permet de reclasser correctement quatre de ces six patients.

La MW étant une hémopathie rare, nous n'avons pas pu créer deux cohortes indépendantes, l'une d'apprentissage puis l'autre de validation. Nous avons ainsi choisi une approche de score par compartiment (MO et sang), à partir des patients dont le phénotype ne présentait aucune ambiguïté phénotypique, pour fixer les seuils décisionnels. Nous avons ensuite appliqué les scores sur ces mêmes patients et les nouveaux patients évalués au laboratoire pendant la période de l'étude. L'application du score sanguin à sept nouveaux patients ayant une forme frontière entre une MW et un LZM, révèle que six d'entre eux ont un résultat en faveur d'une MW, laissant suggérer que les formes frontières s'apparentent davantage à des MW qu'à des LZM phénotypiquement.

Ce score phénotypique peut dans certaines situations ne pas être calculé précisément mais être d'une aide précieuse pour isoler une population pathologique. En effet, depuis la mise en place en 2015 du nouveau panel diagnostique de la MW, la prévalence de détection des clones circulants dans la MW a augmenté, avec en moyenne 86% des patients qui présentent un clone circulant, alors que cette prévalence n'était que de 65% avant 2015. La combinaison de certains marqueurs permet d'isoler des clones pouvant être très minoritaires chez certains patients présentant un GMSI à IgM, alors même que l'ensemble des LyB peuvent présenter une répartition parfaitement normale des chaînes légères polytypiques. L'analyse de patients suivis pour une GMSI à IgM avec ou sans neuropathie anti-MAG montre que près de la moitié d'entre eux ont une population lymphocytaire B monotypique circulante. Le calcul du score sur les patients évaluables montre un clone avec un profil de MW pour 100% et 87% des GMSI à IgM avec ou sans neuropathie anti-MAG respectivement. Il est important de suivre maintenant ces patients afin d'évaluer leur évolution ou non vers une MW.

Comme évoqué précédemment, la quantification des clones très minoritaires peut s'avérer imprécise, l'ensemble des anticorps n'étant pas dans le même tube de marquage. Cette contrainte devrait disparaître avec les avancées technologiques en CMF et notamment le déploiement en routine hospitalière de cytomètres capables d'étudier simultanément une combinaison en 12 ou 13 couleurs. Ainsi, selon la disponibilité des fluorochromes, nous avons le projet de construire un tube contenant les anticorps anti-CD13, -CD19, -CD22, -CD25, -CD27, -CD38, -CD45, -CD79b -FMC7, - $\kappa$  et - $\lambda$ , et en supplément les anticorps anti-CD43, -CD305 et/ou -CD180, ces deux derniers anticorps ayant montré leur intérêt pour départager la MW du LZM (15,108). La pertinence du CD25 est en cours d'évaluation au laboratoire avec un nouvel anticorps anti-CD25 fonctionnel. Il pourra également être inclus dans le score en complément ou en remplacement d'un paramètre existant, selon les résultats obtenus. Avant toute mise en pratique, un important travail de mise au point sera nécessaire pour obtenir une combinaison optimale, tenant compte de la brillance, des compensations, des co-expressions et de la densité antigénique à la surface des LyB pathologiques. A l'avenir, ce nouveau tube sera réalisé en routine, en complément d'un tube de dépistage comprenant notamment les anticorps anti-CD5, -CD10, -CD19, -CD20, -CD23, -CD45 indispensables pour compléter le calcul du score de Matutes et faire la distinction avec un LF CD10<sup>+</sup>. Des acquisitions longues seront nécessaires pour obtenir des LyB résiduels en cas de clone majoritaire ou pour repérer les clones très minoritaires circulants. Cette nouvelle approche devrait nous permettre d'isoler les clones Waldenström circulants avec une grande sensibilité et d'optimiser la distinction phénotypique avec le LZM.

Notre étude doit être complétée par une cohorte de validation prospective du score phénotypique, en cours au laboratoire.

Pour toute demande d'immunophénotypage mettant en évidence une population lymphocytaire B pathologique avec un score de Matutes inférieur ou égal à 3, dans un contexte de pic monoclonal à IgM, de splénomégalie, de suspicion de MW ou de LZM, nous calculons systématiquement le score, adapté au compartiment évalué. Devant la faible incidence de la MW, une étude oligocentrique nationale pourrait être envisagée avec comme contrainte principale la standardisation des données obtenues entre les centres. En effet, l'interprétation des MFI est très dépendante des critères visuels de l'observateur, liés à l'expérience mais également au choix des anticorps, des fluorochromes, des cytomètres... En ce sens, l'obtention de LyB polytypiques résiduels par des acquisitions longues, plus facilement réalisables sur les nouveaux cytomètres, pourrait être une aide importante pour faciliter les interprétations et rendre ce score applicable en routine, de façon multicentrique.

**Le troisième et dernier objectif de notre travail était de confronter les résultats d'immunophénotypages médullaires de patients atteints d'une MW avec un ensemble de données clinico-biologiques**, recueillies en collaboration avec le Service d'Hématologie clinique de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière. Dans le cadre de cette collaboration, Clémentine BOCCON-GIBOD réalise sa thèse d'exercice sur l'étude des corrélations clinico-biologiques selon la présence ou non de cellules tumorales circulantes de MW détectées par CMF.

En complément des analyses statistiques univariées et multivariées, des ACP tenant compte de l'ensemble des données phénotypiques par patient ont été réalisées selon chaque critère clinico-biologique. Très peu d'études se sont intéressées à la corrélation entre un profil phénotypique médullaire de la MW et certains résultats biologiques ou manifestations cliniques. Nous n'avons pas retrouvé l'association entre le profil CD5<sup>+</sup>/FMC7<sup>-</sup> et l'augmentation de l'infiltration médullaire, du pic monoclonal à IgM et l'indication de mise sous traitement, ni l'observation d'une forte expression du CD38 sur les LyB CD23<sup>-</sup>, décrites par San Miguel et coll. en 2003 (84). L'existence probable d'un sous-groupe de patients dont l'expression du CD23 à la surface des LyB pathologiques serait corrélée à un taux d'IgM augmenté et donc plus à risque de développer des complications liées à l'hyperviscosité, n'est pas confirmée dans notre cohorte (96).

Les patients n'ayant que des LyB tumoraux sans LyB polytypiques résiduels, ont tendance à développer des adénopathies et présentent une infiltration médullaire significativement augmentée, avec une proportion plus élevée de patients ayant un pourcentage supérieur à 10% des Ly totaux. Cependant, dans notre cohorte, nous ne retrouvons pas de corrélation entre une charge tumorale supérieure à 10% et l'instauration d'un traitement ni entre l'absence de LyB résiduels et la SG des patients, contrairement aux résultats rapportés sur une plus grande cohorte (87).

Les corrélations avec certaines anomalies moléculaires et cytogénétiques sont difficiles à évaluer en raison d'un effectif trop faible de patients concernés par la mutation ou la modification chromosomique.

Ainsi, seuls trois patients ne présentent pas de mutation du gène *MYD88* dans notre cohorte. Nous n'avons donc pas pu comparer leur profil phénotypique avec celui observé par Jiménez et coll. rapportant une augmentation des pourcentages de FMC7 et CD27 et une diminution du CD23 (25). Aucune association notable n'a été retrouvée entre un phénotype et une anomalie cytogénétique courante. De plus, aucun marqueur phénotypique isolé ou en association n'est prédictif de la réponse au traitement, du nombre de lignes de traitement, de la SSP et de la SG.

Par ailleurs, la répartition des patients mutés (30%) et non mutés (70%) pour le gène *CXCR4* permet la réalisation d'analyses statistiques plus robustes. Nous mettons en évidence que la présence d'une mutation de *CXCR4* est significativement associée à l'absence ou la diminution d'expression du CD38, avec persistance de cette significativité en analyse multivariée. Ceci est d'autant plus intéressant que le marqueur phénotypique qui apparaît le plus associé à certaines données biologiques dans notre étude est le CD38. Ces observations ont été mises en évidence avec le pourcentage de CD38 à la surface des LyB tumoraux médullaires dans notre cohorte de réanalyse, puis confirmées sur une cohorte élargie scindée en deux groupes d'expression du CD38 ( $CD38^{-/+faible}$  et  $CD38^{+}$ ), obtenus à partir du profil FMC7/CD38. Les mutations non-sens  $CXCR4^{S338X}$  recherchées en routine hospitalière pour les patients mutés pour *MYD88* ne représentent que 50% de l'ensemble des mutations, entraînant une possible sous-estimation de la proportion des patients mutés pour *CXCR4*. Parmi les 75 patients évalués, 32 n'ont bénéficié que d'une approche classique détectant  $CXCR4^{S338X}$ . Depuis peu, la mise en place en Hématologie moléculaire d'un panel NGS comprenant *CXCR4* permet de détecter également les mutations autres que S338X. Nos résultats pourront donc s'affiner sur une cohorte prospective. Par ailleurs, nous observons qu'une faible expression du CD38 à la surface des LyB pathologiques est associée à une diminution du taux de plaquettes, une infiltration médullaire plus élevée, cette dernière étant corrélée à la quantité du pic IgM. Ces mêmes observations ont été décrites comme associées à la présence de la mutation de *CXCR4* (41), renforçant le lien entre CD38 et *CXCR4*. Toutefois, il n'existe pas d'association directe entre le statut mutationnel de *CXCR4* et l'infiltration médullaire estimée par CMF, contrairement aux données de la littérature (76,119). L'hémodilution du prélèvement médullaire lors de l'aspiration, non présente sur les prélèvements de BOM, pourrait expliquer en partie ces discordances. Les patients du groupe  $CD38^{-/+faible}$  présentent également plus souvent une indication au traitement. L'expression du CD38 tout comme la présence d'une mutation de *CXCR4* ne sont pas corrélées à la présence ou l'absence d'un clone circulant. Néanmoins, il existe une corrélation inverse significative entre l'expression du CD38 à la surface des LyB pathologiques médullaires et la proportion du clone circulant. Nous pouvons émettre l'hypothèse que tous les patients ayant une MW présenteraient un clone circulant dont la détection dépend de la limite de sensibilité des analyses de biologie actuelles.



Davantage de clones circulants sont détectés par rapport aux années précédentes et l'arrivée des nouvelles combinaisons douze couleurs nous permettra d'augmenter la sensibilité pour vérifier cette hypothèse. De même, dans notre étude, l'infiltration médullaire n'apparaît pas corrélée à la présence ou à l'absence d'un clone circulant mais au pourcentage de clone circulant, renforçant l'hypothèse précédente.

L'association significative entre la présence d'une mutation de *CXCR4* et l'absence ou la diminution d'expression du CD38 sur les LyB pathologiques est en accord avec les données de Roos-Weil et coll. démontrant l'existence, au sein de la MW, de deux groupes distincts de patients selon le profil de méthylation de l'ADN des LyB : un groupe ayant des caractéristiques de cellules B mémoires, l'autre celles de cellules plasmocytaires (44). Les mutations de *CXCR4* étaient significativement retrouvées dans le groupe mémoire tandis que le groupe plasmocytaire présentait une intensité de fluorescence du CD38 statistiquement plus élevée avec d'avantage de del6q. Cependant, nous ne mettons pas en évidence d'association entre l'expression du CD38 et la présence d'une del6q avec nos analyses rétrospectives. Dans notre cohorte, certains patients n'expriment pas le CD27 et ont tendance à exprimer plus fortement le CD38, ce qui pourrait être en accord avec le groupe plasmocytaire.

De plus, nous mettons en évidence un profil phénotypique particulier des patients mutés pour *CXCR4*, avec une faible expression du CD38, ainsi qu'une faible expression des marqueurs CD19, CD79b, FMC7 et CD27. Ces variations phénotypiques n'ont pas été observées dans l'étude publiée en 2016 par Poulain et coll. qui révèle une plus faible expression du CD138 dans le groupe *CXCR4* muté, sans différence d'expression du CD38 et CD27 (120).

Les facteurs liés au clone tumoral comme ceux liés à la régulation par le microenvironnement jouent un rôle important dans la progression tumorale. *CXCR4* et CD38, physiquement proches à la surface du LyB, sont fonctionnellement liés et semblent intervenir dans les mécanismes physiopathologiques, mais leur régulation apparaît complexe et variable selon les hémopathies. Plusieurs équipes se sont intéressées aux interactions entre CD38, *CXCR4* et CD49d principalement dans la LLC. Les cellules de LLC qui migrent présentent une régulation négative de l'expression de *CXCR4* tandis que celles qui ne migrent pas ont une augmentation de l'expression du CD38 et du CD49d (121). Le CD49d, étroitement lié à *CXCR4*, joue le rôle d'intermédiaire dans les interactions entre les cellules et entre les cellules et le microenvironnement (122). L'activation du CD38 et du récepteur *CXCR4* par son ligand CXCL12 potentialiserait l'adhérence des cellules médiée par CD49d, également connu pour générer des signaux de survie et de protection. Dans un modèle cellulaire, la mutation gain de fonction MYD88<sup>L265P</sup> amplifie la survie et la prolifération cellulaire grâce à une activation constitutive des voies de signalisation en aval du BCR, dont la voie JAK/STAT3, qui active NFκB, responsable de la production de cytokines (22).

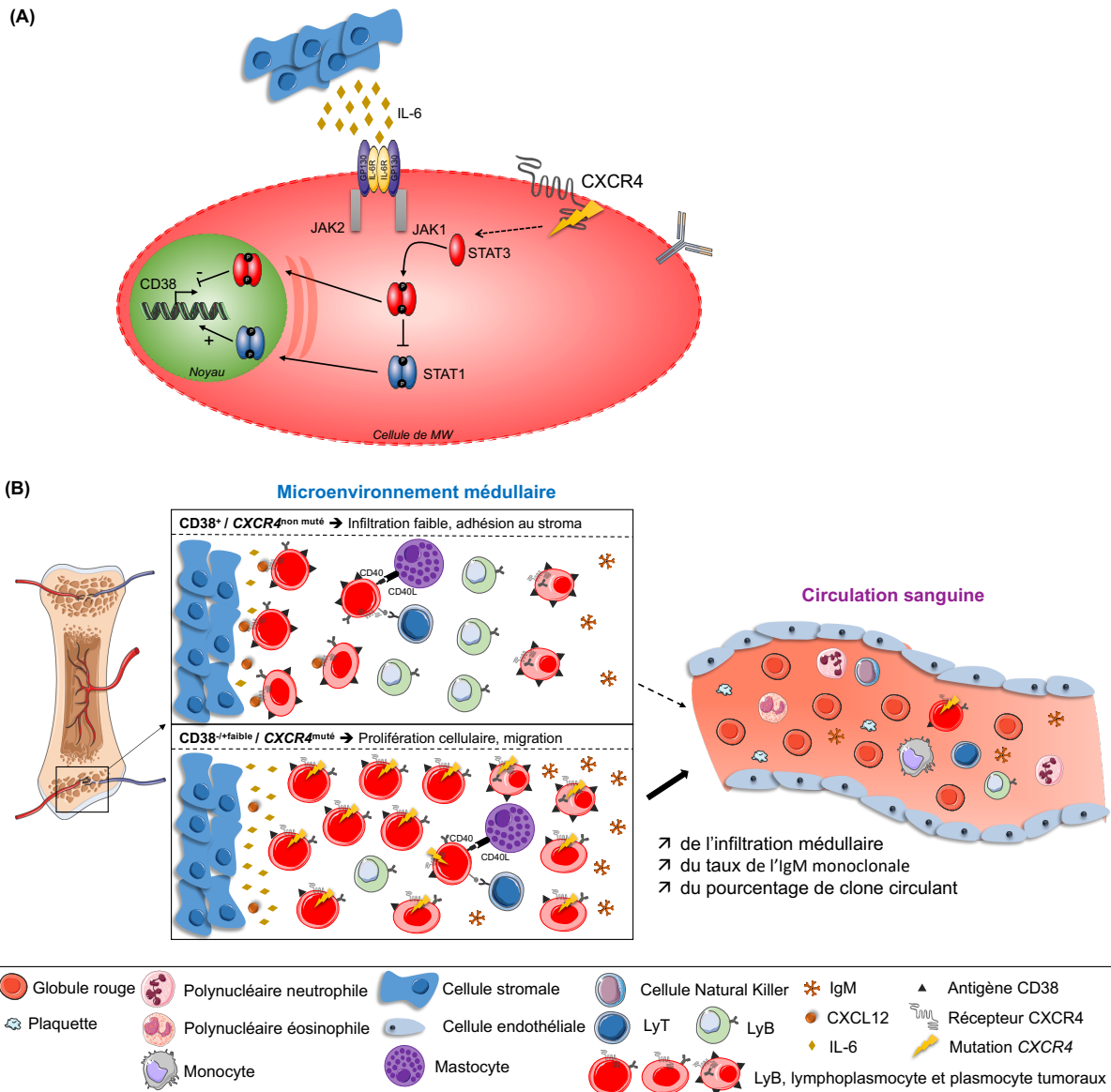
En particulier, l'IL-21 participe à l'activation de la voie de signalisation de STAT3 dont les cibles principales sont l'IL-6 ou des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation plasmocytaire (123). Les mutations de *CXCR4* pourraient constituer un évènement secondaire, responsable également de l'activation de voies de signalisation ou de la modification des interactions de la cellule tumorale avec son microenvironnement. Il a été montré que la voie JAK/STAT3 était responsable d'une régulation à la baisse de l'expression du CD38 dans le MM (124). Cette voie se trouve, entre autres, en aval du récepteur CXCR4, dont la signalisation est soutenue par les mutations décrites dans la MW. La suractivation de la voie CXCR4/JAK/STAT3 pourrait être responsable de l'absence ou la diminution d'expression du CD38 à la surface des LyB tumoraux médullaires.

Toutefois, malgré la probable sous-estimation des patients mutés pour *CXCR4*, certains patients non mutés pour ce gène sont CD38<sup>-/+faible</sup>, suggérant l'existence de mécanismes plus complexes conduisant à diminuer l'expression du CD38. Dans une cohorte de patients atteints de MM, il a été mis en évidence que les cellules stromales présentes dans le microenvironnement médullaire, *via* la sécrétion d'IL-6, peuvent réguler négativement l'expression de CD38 sur les plasmocytes pathologiques, par l'intermédiaire de l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT3 (124). Cette régulation négative par le microenvironnement médullaire pourrait contribuer aux observations faites dans notre cohorte de patients atteints de MW. Malgré l'importance du CD38 dans la pathogénèse de la MW, nous avons choisi de ne pas inclure isolément ce paramètre dans le score phénotypique compte tenu d'une grande hétérogénéité d'expression entre les patients. Ce marqueur semble plus pertinent pour une éventuelle stratification des patients que pour les distinguer d'un autre SLP-B. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour confirmer ces hypothèses (dosage de l'IL-6 dans les prélèvements médullaires par exemple).

Pour synthétiser, la diminution d'expression du CD38 sur la cellule tumorale médullaire pourrait s'expliquer par deux hypothèses principales impliquant la voie de signalisation JAK-STAT3 (Figure 48A) :

- L'activation constitutive de *CXCR4* muté par absence d'internalisation du récepteur maintiendrait les voies de signalisation en aval de CD38 et régulerait à la baisse le CD38.
- La production par le microenvironnement médullaire de facteurs solubles tels que l'IL-6 serait responsable d'une activation de la voie JAK/STAT3 qui régulerait également à la baisse l'expression du CD38.

Cette voie de signalisation est responsable d'une prolifération accrue des cellules tumorales. Les cellules *CXCR4*<sup>muté</sup>/*CD38*<sup>-/+faible</sup> présenteraient une capacité migratoire, responsable d'un passage sanguin plus important tandis que les cellules *CXCR4*<sup>non muté</sup>/*CD38*<sup>+</sup> auraient les propriétés inverses avec une adhésion au stroma médullaire (Figure 48B).



**Figure 48 : Synthèse des hypothèses et observations faites entre CD38 et CXCR4 dans la MW.**  
 A. Hypothèses des voies de signalisation impliquées dans une régulation à la baisse du CD38.  
 B. Corrélations observées entre le statut mutationnel de CXCR4 et CD38.

Enfin, nous avons également porté une attention particulière sur l'expression du CD13, significativement augmentée dans la MW par rapport aux autres SLP-B. Aucune corrélation entre les données cliniques ou biologiques et le pourcentage de CD13 (analyses en variable continue ou par différents groupes de positivité) n'a été mise en évidence. Dans la LLC, l'expression du CD13 dans un sous-groupe de patients serait liée à un mauvais pronostic (92). Cette relation n'a pas été confirmée dans une récente étude, indiquant quant à elle que les LyB de LLC CD13<sup>+</sup> seraient FMC7<sup>+</sup> (93). Transposées à notre cohorte de patients ayant une MW, aucune de ces deux observations n'a été retrouvée.

Nous nous interrogeons donc sur un rôle du CD13 davantage ciblé sur le microenvironnement médullaire que sur la cellule tumorale elle-même.

Initialement absent à la surface des LyB et LyT, une étude a mis en évidence, dans un contexte d'arthrite ou de cancer rénal infiltré par des LyT que l'expression du CD13 serait induite à leur surface par interaction directe avec des cellules adhérentes telles que des fibroblastes, cellules épithéliales, monocytes/macrophages (125). Le CD13 est également impliqué dans l'adhésion et la migration lymphocytaire. Une autre équipe avait précédemment montré que les cellules stromales de la MO régulent négativement l'expression du CD13 *in vitro* par contact direct avec des cellules de leucémies aiguës lymphoïdes bi-phénotypiques CD13<sup>+</sup> (126). Son expression résulterait d'un blocage des voies de transduction du signal induites par les cellules stromales qui physiologiquement suppriment son expression. Par ailleurs, le CD13 est également connu pour réguler négativement l'activation des mastocytes (127), il serait donc intéressant d'étudier le pourcentage de mastocytes médullaires et de le corrélérer à celui du CD13.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Le diagnostic de la MW repose sur un faisceau d'arguments biologiques et cliniques non spécifiques associés à l'exclusion du diagnostic différentiel d'un autre SLP-B. Ce travail rétrospectif nous permet d'avoir une vue d'ensemble des marqueurs phénotypiques exprimés à la surface des LyB pathologiques de la MW. L'étude approfondie du phénotype de la MW et du LZM a permis la définition d'un score diagnostique, adapté au compartiment évalué (médullaire ou sanguin), pour faciliter la différenciation de ces deux hémopathies très proches. Ce score inclut les marqueurs phénotypiques les plus caractéristiques du clone tumoral de la MW et permet ainsi également d'optimiser la détection des clones circulants très minoritaires. Cette hémopathie se caractérise par une grande variabilité clinique et biologique avec des profils d'expression de certains marqueurs phénotypiques (FMC7, CD38, CD27, CD13) très différents selon les patients. Une corrélation significative existe entre l'expression du CD38, le statut mutationnel de *CXCR4* et l'infiltration tumorale. Les mécanismes à l'origine de la pathogénèse de la MW ne sont pas encore totalement connus, mais le microenvironnement médullaire semble jouer un rôle essentiel.

Une étude du microenvironnement médullaire des patients ayant une MW, menée par les Dr D. Roos-Weil et J. Caron, est en cours, en collaboration avec la plateforme de cytométrie du site Pitié-Salpêtrière. Leur objectif principal est d'évaluer ce microenvironnement sur des coupes de BOM de patients par cytométrie de masse, grâce au système d'imagerie cellulaire automatique Hyperion™. Cette technologie permet d'analyser un grand nombre de molécules marquées par des métaux lourds au niveau du stroma médullaire. Selon les résultats de cette étude, nous souhaiterions la compléter par un projet d'étude de la cellule tumorale de la MW par cytométrie de masse, en collaboration avec cette même plateforme. En effet, nous pourrions envisager de rechercher à la surface des cellules pathologiques des ligands dont les récepteurs seraient exprimés dans le stroma médullaire et inversement des récepteurs dont les ligands seraient détectés dans le stroma. Cette approche nous permettrait d'évaluer simultanément de nombreux marqueurs de surface, tout en s'affranchissant des problèmes de compensation dus aux fluorochromes couplés aux anticorps par CMF. De plus, la standardisation de cette technique nous permettrait de comparer le profil des patients du groupe MW avec des logiciels d'analyses non supervisées, pour éventuellement mettre en évidence des sous-groupes selon l'expression de certains marqueurs, et peut-être identifier de nouvelles cibles diagnostiques et/ou thérapeutiques.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Waldenström J. Incipient myelomatosis or «essential» hyperglobulinemia with fibrinogenopenia — a new syndrome? *Acta Med Scand*. 1944;117(3–4):216–47.
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375–90.
3. Groves FD, Travis LB, Devesa SS, Ries LA, Fraumeni JF. Waldenström's macroglobulinemia: incidence patterns in the United States, 1988-1994. *Cancer*. 1998 Mar 15;82(6):1078–81.
4. Phekoo KJ, Jack RH, Davies E, Møller H, Schey SA, South Thames Haematology Specialist Committee. The incidence and survival of Waldenström's Macroglobulinaemia in South East England. *Leuk Res*. 2008 Jan;32(1):55–9.
5. Dimopoulos MA, Panayiotidis P, Mouloupoulos LA, Sfikakis P, Dalakas M. Waldenström's macroglobulinemia: clinical features, complications, and management. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2000 Jan;18(1):214–26.
6. Wang H, Chen Y, Li F, Delasalle K, Wang J, Alexanian R, et al. Temporal and geographic variations of Waldenström macroglobulinemia incidence. *Cancer*. 2012;118(15):3793–800.
7. Treon SP, Hunter ZR, Aggarwal A, Ewen EP, Masota S, Lee C, et al. Characterization of familial Waldenström's macroglobulinemia. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2006 Mar;17(3):488–94.
8. Manasanch EE, Kristinsson SY, Landgren O. Etiology of Waldenström macroglobulinemia: genetic factors and immune-related conditions. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013 Apr;13(2):194–7.
9. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, Cerhan JR, et al. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med*. 2018 Jan 18;378(3):241–9.
10. García-Sanz R, Jiménez C, Puig N, Paiva B, Gutiérrez NC, Rodríguez-Otero P, et al. Origin of Waldenström's macroglobulinaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2016 Jun 1;29(2):136–47.
11. Janz S. Waldenström macroglobulinemia: clinical and immunological aspects, natural history, cell of origin, and emerging mouse models. *ISRN Hematol*. 2013 Sep 9;2013:815325.
12. Babbage G, Townsend M, Zojer N, Mockridge IC, Garand R, Barlogie B, et al. IgM-expressing Waldenström's macroglobulinemia tumor cells reveal a potential for isotype switch events in vivo. *Leukemia*. 2007 Apr;21(4):827–30.
13. Chng WJ, Schop RF, Price-Troska T, Ghobrial I, Kay N, Jelinek DF, et al. Gene-expression profiling of Waldenström macroglobulinemia reveals a phenotype more similar to chronic lymphocytic leukemia than multiple myeloma. *Blood*. 2006 Oct 15;108(8):2755–63.
14. Leleu X, Hunter ZR, Xu L, Roccaro AM, Moreau A-S, Santos DD, et al. Expression of regulatory genes for lymphoplasmacytic cell differentiation in Waldenström Macroglobulinemia. *Br J Haematol*. 2009 Apr;145(1):59–63.
15. Paiva B, Corchete LA, Vidriales M-B, García-Sanz R, Perez JJ, Aires-Mejia I, et al. The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2015 Apr 9;125(15):2370–80.
16. Trojani A, Di Camillo B, Bossi LE, Leuzzi L, Greco A, Tedeschi A, et al. Identification of a Candidate Gene Set Signature for the Risk of Progression in IgM MGUS to Smoldering/Symptomatic Waldenström Macroglobulinemia (WM) by a Comparative Transcriptome Analysis of B Cells and Plasma Cells. *Cancers*. 2021 Jan;13(8):1837.
17. Nguyen-Khac F, Lambert J, Chapiro E, Grelier A, Mould S, Barin C, et al. Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica*. 2013 Apr;98(4):649–54.
18. Chang H, Qi C, Trieu Y, Jiang A, Young KH, Chesney A, et al. Prognostic relevance of 6q deletion in Waldenström's macroglobulinemia: a multicenter study. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009 Mar;9(1):36–8.
19. Braggio E, Philipsborn C, Novak A, Hodge L, Ansell S, Fonseca R. Molecular pathogenesis of Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica*. 2012 Sep;97(9):1281–90.
20. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012 Aug 30;367(9):826–33.
21. Yang G, Buhrlage SJ, Tan L, Liu X, Chen J, Xu L, et al. HCK is a survival determinant transactivated by mutated MYD88, and a direct target of ibrutinib. *Blood*. 2016 Jun 23;127(25):3237–52.
22. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011 Feb 3;470(7332):115–9.
23. Magierowicz M, Tomowiak C, Leleu X, Poulain S. Working Toward a Genomic Prognostic Classification of Waldenström Macroglobulinemia: C-X-C Chemokine Receptor Type 4 Mutation and Beyond. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018 Oct 1;32(5):753–63.
24. Landgren O, Staudt L. MYD88 L265P somatic mutation in IgM MGUS. *N Engl J Med*. 2012 Dec 6;367(23):2255–6; author reply 2256–2257.
25. Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC, Giraldo P, Mariano Hernández J, Escalante F, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia*. 2013 Aug;27(8):1722–8.
26. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, Rattotti S, Riboni R, et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013 Mar 28;121(13):2522–8.
27. Treon SP, Xu L, Hunter Z. MYD88 Mutations and Response to Ibrutinib in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2015 Aug 6;373(6):584–6.
28. Ngo HT, Leleu X, Lee J, Jia X, Melhem M, Runnels J, et al. SDF-1/CXCR4 and VLA-4 interaction regulates homing in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2008 Jul 1;112(1):150–8.

29. Kaiser LM, Hunter ZR, Treon SP, Buske C. CXCR4 in Waldenström's Macroglobulinemia: chances and challenges. *Leukemia*. 2021 Feb;35(2):333–45.
30. Cao Y, Hunter ZR, Liu X, Xu L, Yang G, Chen J, et al. The WHIM-like CXCR4(S338X) somatic mutation activates AKT and ERK, and promotes resistance to ibrutinib and other agents used in the treatment of Waldenström's Macroglobulinemia. *Leukemia*. 2015 Jan;29(1):169–76.
31. Hunter ZR, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood*. 2014 Mar 13;123(11):1637–46.
32. Xu L, Hunter ZR, Tsakmaklis N, Cao Y, Yang G, Chen J, et al. Clonal architecture of CXCR4 WHIM-like mutations in Waldenström Macroglobulinaemia. *Br J Haematol*. 2016 Mar;172(5):735–44.
33. Varettoni M, Zibellini S, Defrancesco I, Ferretti VV, Rizzo E, Malcovati L, et al. Pattern of somatic mutations in patients with Waldenström macroglobulinemia or IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica*. 2017 Dec;102(12):2077–85.
34. Castillo JJ, Moreno DF, Arbelaez MI, Hunter ZR, Treon SP. CXCR4 mutations affect presentation and outcomes in patients with Waldenström macroglobulinemia: A systematic review. *Expert Rev Hematol*. 2019 Oct;12(10):873–81.
35. Hunter ZR, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood*. 2014 Mar 13;123(11):1637–46.
36. Treon SP, Xu L, Guerrero ML, Jimenez C, Hunter ZR, Liu X, et al. Genomic Landscape of Waldenström Macroglobulinemia and Its Impact on Treatment Strategies. *J Clin Oncol*. 2020 Apr 10;38(11):1198–208.
37. Roos-Weil D, Decaudin C, Armand M, Della-Valle V, Diop MK, Ghamlouch H, et al. A Recurrent Activating Missense Mutation in Waldenström Macroglobulinemia Affects the DNA Binding of the ETS Transcription Factor SPI1 and Enhances Proliferation. *Cancer Discov*. 2019 Jun;9(6):796–811.
38. Gustine JN, Tsakmaklis N, Demos MG, Kofides A, Chen JG, Liu X, et al. TP53 mutations are associated with mutated MYD88 and CXCR4, and confer an adverse outcome in Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol*. 2019;184(2):242–5.
39. Poulain S, Roumier C, Bertrand E, Renneville A, Caillault-Venet A, Doye E, et al. TP53 Mutation and Its Prognostic Significance in Waldenström's Macroglobulinemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Oct 15;23(20):6325–35.
40. Varettoni M, Zibellini S, Defrancesco I, Ferretti VV, Rizzo E, Malcovati L, et al. Pattern of somatic mutations in patients with Waldenström macroglobulinemia or IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica*. 2017 Dec;102(12):2077–85.
41. Krzisch D, Guedes N, Boccon-Gibod C, Baron M, Bravetti C, Davi F, et al. Cytogenetic and molecular abnormalities in Waldenström's macroglobulinemia patients: correlations and prognostic impact. *Am J Hematol*. 2021 Aug 31;
42. Poulain S, Herbaux C, Bertrand E, Decambron A, Fouquet G, Boyle E, et al. Genomic studies have identified multiple mechanisms of genetic changes in Waldenström macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013 Apr;13(2):202–4.
43. Roccaro AM, Sacco A, Chen C, Runnels J, Leleu X, Azab F, et al. microRNA expression in the biology, prognosis, and therapy of Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2009 Apr 30;113(18):4391–402.
44. Roos-Weil D, Giacomelli B, Armand M, Della-Valle V, Ghamlouch H, Decaudin C, et al. Identification of 2 DNA methylation subtypes of Waldenström macroglobulinemia with plasma and memory B-cell features. *Blood*. 2020 Jul 30;136(5):585–95.
45. Agarwal A, Ghobrial IM. The bone marrow microenvironment in Waldenström macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013 Apr;13(2):218–21.
46. Jalali S, Ansell SM. Role of the Bone Marrow Niche in Supporting the Pathogenesis of Lymphoid Malignancies. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jul 28;9:692320.
47. Tournilhac O, Santos DD, Xu L, Kutok J, Tai Y-T, Le Gouill S, et al. Mast cells in Waldenström's macroglobulinemia support lymphoplasmacytic cell growth through CD154/CD40 signaling. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2006 Aug;17(8):1275–82.
48. Ho AW, Hatjiharissi E, Ciccarelli BT, Branagan AR, Hunter ZR, Leleu X, et al. CD27-CD70 interactions in the pathogenesis of Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4683–9.
49. Terpos E, Tasidou A, Kastritis E, Eleftherakis-Papaiakovou E, Gavriatopoulou M, Migkou M, et al. Angiogenesis in Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009 Mar;9(1):46–9.
50. Simon L, Fitsiori A, Lemal R, Dupuis J, Carpentier B, Boudin L, et al. Bing-Neel syndrome, a rare complication of Waldenström macroglobulinemia: analysis of 44 cases and review of the literature. A study on behalf of the French Innovative Leukemia Organization (FILO). *Haematologica*. 2015 Dec;100(12):1587–94.
51. Ghobrial IM, Gertz MA, Fonseca R. Waldenström macroglobulinaemia. *Lancet Oncol*. 2003 Nov 1;4(11):679–85.
52. Viala K, Stojkovic T, Doncker A-V, Maisonobe T, Lenglet T, Bruneteau G, et al. Heterogeneous spectrum of neuropathies in Waldenström's macroglobulinemia: a diagnostic strategy to optimize their management. *J Peripher Nerv Syst*. 2012;17(1):90–101.
53. Le Cann M, Bouhour F, Viala K, Simon L, Tard C, Rossi C, et al. CANOMAD: a neurological monoclonal gammopathy of clinical significance that benefits from B-cell-targeted therapies. *Blood*. 2020 Nov 19;136(21):2428–36.
54. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML, et al. Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003 Apr;30(2):110–5.

55. Castillo JJ, Garcia-Sanz R, Hatjiharissi E, Kyle RA, Leleu X, McMaster M, et al. Recommendations for the diagnosis and initial evaluation of patients with Waldenström Macroglobulinaemia: A Task Force from the 8th International Workshop on Waldenström Macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2016 Oct;175(1):77–86.
56. Kastritis E, Leblond V, Dimopoulos MA, Kimby E, Staber P, Kersten MJ, et al. Waldenström's macroglobulinaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018 Oct;29:iv41–50.
57. Itzykson R, Le Garff-Tavernier M, Katsahian S, Diemert M-C, Musset L, Leblond V. Serum-free light chain elevation is associated with a shorter time to treatment in Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica.* 2008 May;93(5):793–4.
58. Kyle RA, Treon SP, Alexanian R, Barlogie B, Björkholm M, Dhodapkar M, et al. Prognostic markers and criteria to initiate therapy in Waldenström's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Semin Oncol.* 2003 Apr;30(2):116–20.
59. Castillo JJ, Advani RH, Branagan AR, Buske C, Dimopoulos MA, D'Sa S, et al. Consensus treatment recommendations from the tenth International Workshop for Waldenström Macroglobulinaemia. *Lancet Haematol.* 2020 Nov;7(11):e827–37.
60. Dimopoulos MA, Zervas C, Zomas A, Hamilos G, Gika D, Efstathiou E, et al. Extended rituximab therapy for previously untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma.* 2002 Dec;3(3):163–6.
61. Gertz MA, Rue M, Blood E, Kaminer LS, Vesole DH, Greipp PR. Multicenter phase 2 trial of rituximab for Waldenström macroglobulinemia (WM): an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E3A98). *Leuk Lymphoma.* 2004 Oct;45(10):2047–55.
62. Dimopoulos MA, Anagnostopoulos A, Kyrtsolis M-C, Zervas K, Tsatalas C, Kokkinis G, et al. Primary treatment of Waldenström macroglobulinemia with dexamethasone, rituximab, and cyclophosphamide. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2007 Aug 1;25(22):3344–9.
63. Laribi K, Poulain S, Willems L, Merabet F, Calloch RL, Eveillard JR, et al. Bendamustine plus rituximab in newly-diagnosed Waldenström macroglobulinaemia patients. A study on behalf of the French Innovative Leukaemia Organization (FILO). *Br J Haematol.* 2019;186(1):146–9.
64. Gavriatopoulou M, García-Sanz R, Kastritis E, Morel P, Kyrtsolis M-C, Michalis E, et al. BDR in newly diagnosed patients with WM: final analysis of a phase 2 study after a minimum follow-up of 6 years. *Blood.* 2017 Jan 26;129(4):456–9.
65. Meid K, Dubeau T, Severns P, Gustine J, Ghobrial IM, Castillo JJ, et al. Long-Term Follow-up of a Prospective Clinical Trial of Carfilzomib, Rituximab and Dexamethasone (CaRD) in Waldenström's Macroglobulinemia. *Blood.* 2017 Dec 7;130(Supplement 1):2772.
66. Treon SP, Gustine J, Meid K, Yang G, Xu L, Liu X, et al. Ibrutinib Monotherapy in Symptomatic, Treatment-Naïve Patients With Waldenström Macroglobulinemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2018 Sep 20;36(27):2755–61.
67. Dimopoulos MA, Tedeschi A, Trotman J, García-Sanz R, Macdonald D, Leblond V, et al. Phase 3 Trial of Ibrutinib plus Rituximab in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med [Internet].* 2018 Jun 1 [cited 2021 Apr 4]; Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1802917>
68. Grimont CN, Castillo Almeida NE, Gertz MA. Current and Emerging Treatments for Waldenström Macroglobulinemia. *Acta Haematol.* 2021;144(2):146–57.
69. Bustoros M, Sklavenitis-Pistofidis R, Kapoor P, Liu C-J, Kastritis E, Zanwar S, et al. Progression Risk Stratification of Asymptomatic Waldenström Macroglobulinemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2019 Jun 1;37(16):1403–11.
70. Castillo JJ, Olszewski AJ, Kanan S, Meid K, Hunter ZR, Treon SP. Overall survival and competing risks of death in patients with Waldenström macroglobulinaemia: an analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database. *Br J Haematol.* 2015 Apr;169(1):81–9.
71. Steingrímsson V, Lund SH, Tureson I, Goldin LR, Björkholm M, Landgren O, et al. Population-based study on the impact of the familial form of Waldenström macroglobulinemia on overall survival. *Blood.* 2015 Mar 26;125(13):2174–5.
72. Morel P, Duhamel A, Gobbi P, Dimopoulos MA, Dhodapkar MV, McCoy J, et al. International prognostic scoring system for Waldenström macroglobulinemia. *Blood.* 2009 Apr 30;113(18):4163–70.
73. Kastritis E, Morel P, Duhamel A, Gavriatopoulou M, Kyrtsolis MC, Durot E, et al. A revised international prognostic score system for Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia.* 2019 Nov;33(11):2654–61.
74. Ghobrial IM, Fonseca R, Gertz MA, Plevak MF, Larson DR, Therneau TM, et al. Prognostic model for disease-specific and overall mortality in newly diagnosed symptomatic patients with Waldenström macroglobulinaemia. *Br J Haematol.* 2006 Apr;133(2):158–64.
75. García-Sanz R, Dogliotti I, Zaccaria GM, Ocio EM, Rubio A, Murillo I, et al. 6q deletion in Waldenström macroglobulinaemia negatively affects time to transformation and survival. *Br J Haematol.* 2021 Mar;192(5):843–52.
76. Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström macroglobulinemia. *Blood.* 2014 May 1;123(18):2791–6.
77. Treon SP, Gustine J, Xu L, Manning RJ, Tsakmaklis N, Demos M, et al. MYD88 wild-type Waldenström Macroglobulinaemia: differential diagnosis, risk of histological transformation, and overall survival. *Br J Haematol.* 2018;180(3):374–80.
78. Zanwar S, Abeykoon JP, Durot E, King R, Perez Burbano GE, Kumar S, et al. Impact of MYD88L265P mutation status on histological transformation of Waldenström Macroglobulinemia. *Am J Hematol.* 2020 Mar;95(3):274–81.



79. Gustine JN, Xu L, Tsakmaklis N, Demos MG, Kofides A, Chen JG, et al. CXCR4S338X clonality is an important determinant of ibrutinib outcomes in patients with Waldenström macroglobulinemia. *Blood Adv*. 2019 Sep 30;3(19):2800–3.
80. Treon SP, Tripsas CK, Meid K, Kanan S, Sheehy P, Chuma S, et al. Carfilzomib, rituximab, and dexamethasone (CaRD) treatment offers a neuropathy-sparing approach for treating Waldenström's macroglobulinemia. *Blood*. 2014 Jul 24;124(4):503–10.
81. Castillo JJ, Meid K, Flynn CA, Chen J, Demos MG, Guerrero ML, et al. Ixazomib, dexamethasone, and rituximab in treatment-naïve patients with Waldenström macroglobulinemia: long-term follow-up. *Blood Adv*. 2020 Aug 21;4(16):3952–9.
82. Gascue A, Merino J, Paiva B. *Flow Cytometry*. *Hematol Clin*. 2018 Oct 1;32(5):765–75.
83. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):3941–67.
84. San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E, Mateo G, Sánchez-Guijo F, Sánchez ML, et al. Immunophenotypic analysis of Waldenström's macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003 Apr;30(2):187–95.
85. Morice WG, Chen D, Kurtin PJ, Hanson CA, McPhail ED. Novel immunophenotypic features of marrow lymphoplasmacytic lymphoma and correlation with Waldenström's macroglobulinemia. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2009 Jun;22(6):807–16.
86. Ocio EM, Hernandez JM, Mateo G, Sanchez ML, Gonzalez B, Vidriales B, et al. Immunophenotypic and cytogenetic comparison of Waldenström's macroglobulinemia with splenic marginal zone lymphoma. *Clin Lymphoma*. 2005 Mar;5(4):241–5.
87. Paiva B, Montes MC, García-Sanz R, Ocio EM, Alonso J, de las Heras N, et al. Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenström's clone in IgM-MGUS and Waldenström's Macroglobulinemia: new criteria for differential diagnosis and risk stratification. *Leukemia*. 2014 Jan;28(1):166–73.
88. Konoplev S, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE, Jorgensen JL, Lin P. Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia. *Am J Clin Pathol*. 2005 Sep;124(3):414–20.
89. Owen RG, Hillmen P, Rawstron AC. CD52 expression in Waldenström's macroglobulinemia: implications for alemtuzumab therapy and response assessment. *Clin Lymphoma*. 2005 Mar;5(4):278–81.
90. Raimbault A, Machherndl-Spandl S, Itzykson R, Clauser S, Chapuis N, Mathis S, et al. CD13 expression in B cell malignancies is a hallmark of plasmacytic differentiation. *Br J Haematol*. 2019;184(4):625–33.
91. Nakase K, Kita K, Shiku H, Tanaka I, Nasu K, Dohy H, et al. Myeloid antigen, CD13, CD14, and/or CD33 expression is restricted to certain lymphoid neoplasms. *Am J Clin Pathol*. 1996 Jun;105(6):761–8.
92. Pinto A, Del Vecchio L, Carbone A, Roncadin M, Volpe R, Serraino D, et al. Expression of myelomonocytic antigens is associated with unfavourable clinicoprognostic factors in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1991 Feb;2 Suppl 2:107–13.
93. Lau H, Nagy A, Atwater SK, Cascio MJ, Ohgami RS. An integrated flow cytometry analysis of 286 mature B cell neoplasms identifies CD13 as a useful marker for diagnostic subtyping. *Int J Lab Hematol*. 2018 Dec;40(6):715–20.
94. Owen RG, Barrans SL, Richards SJ, O'Connor SJM, Child JA, Parapia LA, et al. Waldenström Macroglobulinemia: Development of Diagnostic Criteria and Identification of Prognostic Factors. *Am J Clin Pathol*. 2001 Sep 1;116(3):420–8.
95. Remstein ED, Hanson CA, Kyle RA, Hodnefield JM, Kurtin PJ. Despite apparent morphologic and immunophenotypic heterogeneity, Waldenström's macroglobulinemia is consistently composed of cells along a morphologic continuum of small lymphocytes, plasmacytoid lymphocytes, and plasma cells. *Semin Oncol*. 2003 Apr 1;30(2):182–6.
96. Hunter ZR, Branagan AR, Manning R, Patterson CJ, Santos DD, Tournilhac O, et al. CD5, CD10, and CD23 expression in Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma*. 2005 Mar;5(4):246–9.
97. Poulain S, Wemeau M, Balkaran S, Hivert B, Hautecoeur A, Rossignol J, et al. [Waldenström's macroglobulinemia]. *Rev Med Interne*. 2010 May;31(5):385–94.
98. Flores-Montero J, Tute R de, Paiva B, Perez JJ, Böttcher S, Wind H, et al. Immunophenotype of normal vs. myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):61–72.
99. Pasricha S-R, Juneja SK, Westerman DA, Came NA. Bone-marrow plasma cell burden correlates with IgM paraprotein concentration in Waldenström macroglobulinaemia. *J Clin Pathol*. 2011 Jun;64(6):520–3.
100. Gayet M, Leymarie V, Derouault P, Guérin E, Vaidié J, Pascal V, et al. Flow cytometry detection of CD138 expression continuum between monocytic B and plasma cells is associated with both high IgM peak levels and MYD88 mutation and contributes to diagnosis of Waldenström macroglobulinemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2021 Feb 25;
101. Landau DA, Carter SL, Getz G, Wu CJ. Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications. *Leukemia*. 2014 Jan;28(1):34–43.
102. Kriangkum J, Taylor BJ, Treon SP, Mant MJ, Reiman T, Belch AR, et al. Molecular Characterization of Waldenström's Macroglobulinemia Reveals Frequent Occurrence of Two B-Cell Clones Having Distinct IgH VDJ Sequences. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 1;13(7):2005–13.
103. Wang W, Lin P. Lymphoplasmacytic lymphoma and Waldenström macroglobulinaemia: clinicopathological features and differential diagnosis. *Pathology (Phila)*. 2020 Jan;52(1):6–14.
104. Ocio EM, del Carpio D, Caballero Á, Alonso J, Paiva B, Pesoa R, et al. Differential diagnosis of IgM MGUS and WM according to B-lymphoid infiltration by morphology and flow cytometry. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011 Feb;11(1):93–5.
105. Costopoulos et Le Garff-Tavernier E. Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie en flux. *EM-Consulte*. 2016.

106. Thieblemont C, Felman P, Callet-Bauchu E, Traverse-Glehen A, Salles G, Coiffier B, et al. Splenic marginal-zone lymphoma: a distinct clinical and pathological entity. *Lancet Oncol*. 2003 Feb 1;4(2):95–103.
107. Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Siakantaris P, Kontopidou FN, Dimopoulou MN, et al. Waldenström's macroglobulinemia: clinical course and prognostic factors in 60 patients. Experience from a single hematology unit. *Ann Hematol*. 2001 Dec;80(12):722–7.
108. Mayeur-Rousse C, Guy J, Miguet L, Bouyer S, Geneviève F, Robillard N, et al. CD180 expression in B-cell lymphomas: A multicenter GEIL study. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(5):462–6.
109. Olteanu H, Fenske TS, Harrington AM, Szabo A, He P, Kroft SH. CD23 expression in follicular lymphoma: clinicopathologic correlations. *Am J Clin Pathol*. 2011 Jan;135(1):46–53.
110. Gao J, Peterson L, Nelson B, Goolsby C, Chen Y-H. Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2009 Nov;132(5):699–706.
111. Schuster SR, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Morice W, Aspitia AM, Ansell S, et al. IgM multiple myeloma: disease definition, prognosis, and differentiation from Waldenström's macroglobulinemia. *Am J Hematol*. 2010 Nov;85(11):853–5.
112. Owen RG, Feyler S, O'Connor SJ, Bond LR, Tute RM de, Rawstron AC. Defining IgM multiple myeloma. *Am J Hematol*. 2011;86(8):717–717.
113. Willenbacher W, Willenbacher E, Brunner A, Manzl C. Improved accuracy of discrimination between IgM multiple myeloma and Waldenström macroglobulinaemia by testing for MYD88 L265P mutations. *Br J Haematol*. 2013 Jun;161(6):902–4.
114. Owen RG, Kyle RA, Stone MJ, Rawstron AC, Leblond V, Merlini G, et al. Response assessment in Waldenström macroglobulinaemia: update from the VIth International Workshop. *Br J Haematol*. 2013 Jan;160(2):171–6.
115. García-Sanz R, Ocío E, Caballero A, Magalhães RJP, Alonso J, López-Anglada L, et al. Post-treatment bone marrow residual disease > 5% by flow cytometry is highly predictive of short progression-free and overall survival in patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011 Feb;11(1):168–71.
116. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML, et al. Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003 Apr;30(2):110–5.
117. Solly F, Rigollet L, Baseggio L, Guy J, Borgeot J, Guérin E, et al. Comparable flow cytometry data can be obtained with two types of instruments, Canto II, and Navios. A GEIL study. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2013 Dec;83(12):1066–72.
118. Duong Van Huyen JP, Molina T, Delmer A, Audouin J, Le Tourneau A, Zittoun R, et al. Splenic marginal zone lymphoma with or without plasmacytic differentiation. *Am J Surg Pathol*. 2000 Dec;24(12):1581–92.
119. Schmidt J, Federmann B, Schindler N, Steinhilber J, Bonzheim I, Fend F, et al. MYD88 L265P and CXCR4 mutations in lymphoplasmacytic lymphoma identify cases with high disease activity. *Br J Haematol*. 2015 Jun;169(6):795–803.
120. Poulain S, Roumier C, Venet-Caillaud A, Figeac M, Herbaux C, Marot G, et al. Genomic Landscape of CXCR4 Mutations in Waldenström Macroglobulinemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Mar 15;22(6):1480–8.
121. Quiroga M, Henneberg M, Niedermeier M, Burger JA. CD62L (L-Selectin), CXCR4, CD49d, and CD38 Contribute to Migration of Chronic Lymphocytic B Cells Beneath Marrow Stromal Cells. *Blood*. 2007 Nov 16;110(11):1119.
122. Dal Bo M, Tissino E, Benedetti D, Caldana C, Bomben R, Del Poeta G, et al. Microenvironmental interactions in chronic lymphocytic leukemia: the master role of CD49d. *Semin Hematol*. 2014 Jul;51(3):168–76.
123. Hodge LS, Ziesmer SC, Yang ZZ, Secreto FJ, Gertz MA, Novak AJ, et al. IL-21 in the bone marrow microenvironment contributes to IgM secretion and proliferation of malignant cells in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2012 Nov 1;120(18):3774–82.
124. Ogiya D, Liu J, Ohguchi H, Kurata K, Samur MK, Tai Y-T, et al. The JAK-STAT pathway regulates CD38 on myeloma cells in the bone marrow microenvironment: therapeutic implications. *Blood*. 2020 Nov 12;136(20):2334–45.
125. Riemann D, Kehlen A, Thiele K, Löhn M, Langner J. Induction of aminopeptidase N/CD13 on human lymphocytes after adhesion to fibroblast-like synoviocytes, endothelial cells, epithelial cells, and monocytes/macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 Apr 1;158(7):3425–32.
126. Saito M, Kumagai M, Okazaki T, Nakazawa S, Shapiro LH, Look AT, et al. Stromal cell-mediated transcriptional regulation of the CD13/aminopeptidase N gene in leukemic cells. *Leukemia*. 1995 Sep;9(9):1508–16.
127. Zotz JS, Wölbing F, Lassnig C, Kauffmann M, Schulte U, Kolb A, et al. CD13/aminopeptidase N is a negative regulator of mast cell activation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2016 Jun;30(6):2225–35.

## ANNEXES

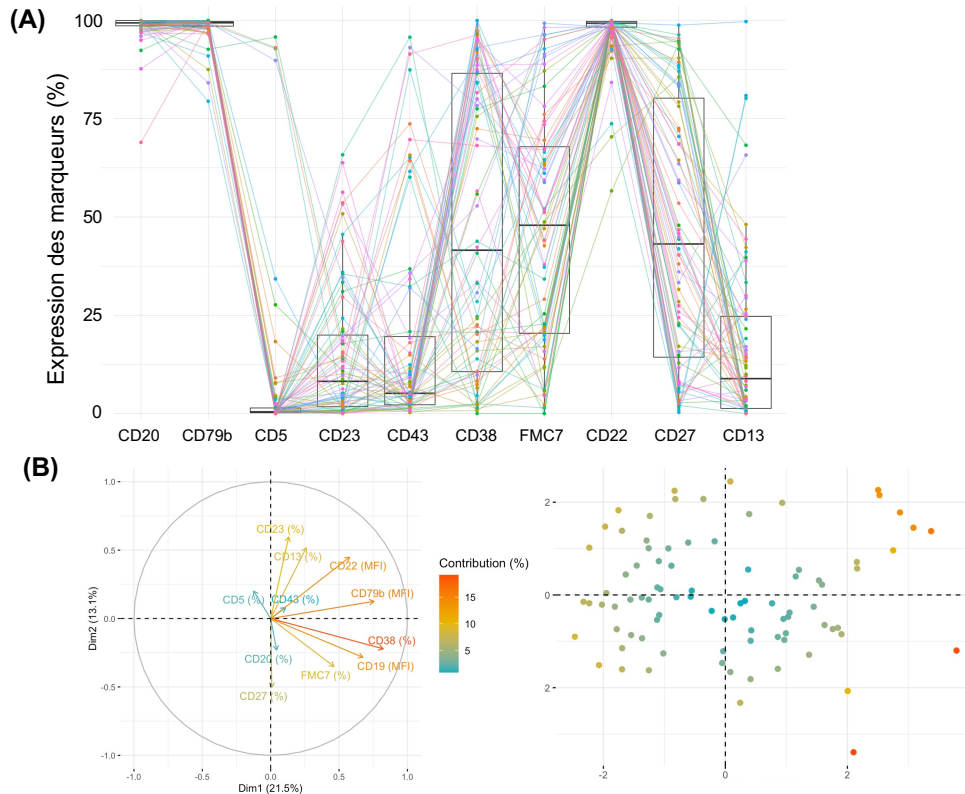
		Contrôles (n=11)	MW (n=86)	LZM (n=40)	LLC (n=11)	LF (n=9)	LCM (n=7)
<b>Prélèvements</b>		MO : n=2 Sang : n=9	MO : n=86	MO : n=6 Sang : n=34	MO : n=3 Sang : n=8	Sang : n=9	MO : n=2 Sang : n=5
<b>CD19</b>	<b>MFI, Médiane [IIQ]</b>	4682 [4047-5179]	3036 [2061-4237]	4433 [2961-6232]	3313 [2847-5220]	1270 [881-2042]	1833 [1700-2580]
	<b>RFI, Médiane [IIQ]</b>	172 [158-202]	100 [64-133]	158 [103-210]	129 [111-204]	49 [30-76]	70 [61-101]
<b>CD20</b>	<b>NA, n</b>	0	1	0	0	0	0
	<b>≥ 30%, % (n)</b>	100 (11)	100 (85)	100 (40)	64 (7)	100 (9)	100 (7)
	<b>MFI, Médiane [IIQ]</b>	9792 [3379-13952]	4657 [2281-7941]	5811 [3640-18563]	8591 [1257-12280]	3325 [2452-10956]	5576 [4442-12787]
	<b>RFI, Médiane [IIQ]</b>	383 [108-545]	111 [50-259]	178 [102-450]	336 [49-480]	130 [80-300]	121 [73-318]
<b>&lt; 30%, % (n)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	36 (4)	0 (0)	0 (0)	
<b>CD79b</b>	<b>NA, n</b>	0	1	0	0	0	1
	<b>≥ 30%, % (n)</b>	100 (11)	100 (85)	98 (39)	91 (10)	100 (9)	100 (6)
	<b>MFI, Médiane [IIQ]</b>	3973 [2570-4370]	7992 [3960-12612]	4419 [1477-9825]	1142 [253-1346]	9162 [2444-16608]	3884 [648-6651]
	<b>RFI, Médiane [IIQ]</b>	155 [100-171]	215 [101-380]	125 [50-283]	37 [10-53]	358 [95-546]	140 [22-187]
<b>&lt; 30%, % (n)</b>	0 (0)	0 (0)	2 (1)	9 (1)	0 (0)	0 (0)	
<b>CD5</b>	<b>≥ 30%, % (n)</b>	0 (0)	9 (8)	17 (7)	100 (11)	0 (0)	100 (7)
	<b>&lt; 30%, % (n)</b>	100 (11)	91 (78)	83 (33)	0 (0)	100 (9)	0 (0)
<b>CD23</b>	<b>NA, n</b>	3	2	0	0	0	0
	<b>≥ 30%, % (n)</b>	75 (6)	18 (15)	33 (13)	82 (9)	78 (7)	0 (0)
	<b>&lt; 30%, % (n)</b>	25 (2)	82 (69)	77 (27)	18 (1)	12 (2)	100 (7)
<b>CD43</b>	<b>NA, n</b>	3	8	2	0	2	2
	<b>≥ 30%, % (n)</b>	0	22 (17)	3 (1)	82 (9)	0	80 (4)
	<b>&lt; 30%, % (n)</b>	100 (8)	78 (61)	97 (37)	18 (2)	100 (7)	20 (1)
<b>CD38</b>	<b>NA, n</b>	3	2	0	1	0	0
	<b>≥ 30%, % (n)</b>	100 (8)	58 (49)	35 (14)	70 (7)	89 (8)	100 (7)
	<b>MFI, Médiane [IIQ]</b>	966 [513-1221]	860 [321-1832]	955 [284-2644]	612 [399-1119]	868 [278-1579]	1441 [1014-2276]
	<b>RFI, Médiane [IIQ]</b>	15 [6-27]	14 [7-35]	13 [4-38]	7 [4-15]	14 [6-21]	34 [26-43]
<b>&lt; 30%, % (n)</b>	0 (0)	42 (35)	65 (26)	30 (3)	11 (1)	0 (0)	
<b>FMC7</b>	<b>NA, n</b>	3	2	0	0	0	0
	<b>≥ 30%, % (n)</b>	100 (8)	63 (53)	98 (39)	45 (5)	100 (9)	100 (7)
	<b>MFI, Médiane [IIQ]</b>	2424 [1971-3679]	732 [513-2103]	5076 [3034-11315]	686 [405-2847]	2486 [1130-3890]	5990 [4887-8228]
	<b>RFI, Médiane [IIQ]</b>	65 [24-127]	12 [7-23]	48 [21-182]	14 [6-75]	25 [9-83]	36 [32-70]
<b>&lt; 30%, % (n)</b>	0 (0)	37 (31)	2 (1)	55 (6)	0 (0)	0 (0)	
<b>CD22</b>	<b>NA, n</b>	1	5	3	1	1	1
	<b>≥ 30%, % (n)</b>	100 (10)	100 (81)	100 (37)	90 (9)	100 (8)	100 (6)
	<b>MFI, Médiane [IIQ]</b>	3231 [2414-3949]	932 [649-1196]	2056 [1225-4977]	639 [472-1130]	800 [746-1813]	1000 [538-1524]
	<b>RFI, Médiane [IIQ]</b>	126 [94-154]	36 [24-47]	80 [47-194]	25 [18-44]	30 [27-71]	39 [21-56]
<b>&lt; 30%, % (n)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (1)	0 (0)	0 (0)	
<b>CD27</b>	<b>NA, n</b>	2	8	4	0	0	1
	<b>≥ 30%, % (n)</b>	22 (2)	60 (47)	89 (32)	100 (11)	56 (5)	50 (3)
	<b>MFI, Médiane [IIQ]</b>	855 [595-1683]	335 [248-538]	838 [416-1197]	719 [228-1869]	343 [214-730]	906 [858-963]
	<b>RFI, Médiane [IIQ]</b>	33 [23-42]	11 [5-16]	23 [13-42]	19 [9-51]	13 [4-27]	35 [34-38]
<b>&lt; 30%, % (n)</b>	78 (7)	40 (31)	11 (4)	0 (0)	44 (4)	50 (3)	
<b>CD13</b>	<b>NA, n</b>	1	5	2	0	0	0
	<b>≥ 2%, % (n)</b>	0 (0)	68 (55)	26 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<b>MFI, Médiane [IIQ]</b>	NA	128 [44-238]	136 [49-166]	NA	NA	NA
	<b>RFI, Médiane [IIQ]</b>	NA	4 [2-9]	5 [2-7]	NA	NA	NA
<b>&lt; 2%, % (n)</b>	100 (10)	32 (26)	74 (28)	100 (11)	100 (9)	100 (7)	

**Annexe 1 : Résultats phénotypiques des patients selon les différents groupes.**

		MW vs Contrôles	MW vs LZM	MW vs LLC	MW vs LF	MW vs LCM	LyB résiduels / LyB pathologiques (MW)
<b>CD19</b>	MFI, Médiane	0,0089	0,0006	0,3307	0,0009	0,0434	<0,0001
	RFI, Médiane	<0,0001	<0,0001	0,0256	0,0022	0,3553	
<b>CD20</b>	%, Médiane	0,1867	0,0451	0,0651	0,0266	0,6308	0,0506
	MFI, Médiane	0,0886	0,0056	0,5243	0,7131	0,2265	
	RFI, Médiane	0,0163	0,0011	0,1944	0,4171	0,4520	
<b>CD79</b>	%, Médiane	<0,0001	0,0833	0,0013	0,0018	0,0295	<0,0001
	MFI, Médiane	0,0010	0,0127	<0,0001	0,9405	0,0331	
	RFI, Médiane	0,0361	0,0480	<0,0001	0,4624	0,0590	
<b>CD5</b>	%, Médiane	0,0003	0,0005	<0,0001	0,0047	<0,0001	NA
<b>CD23</b>	%, Médiane	<0,0001	0,2265	<0,0001	0,0016	0,5962	NA
<b>CD43</b>	%, Médiane	0,6872	0,0002	<0,0001	0,2388	0,0055	NA
<b>CD38</b>	%, Médiane	0,0196	0,0389	0,6402	0,149	0,0002	NA
	MFI, Médiane	0,935	0,6915	0,6960	0,7247	0,0791	
	RFI, Médiane	0,9192	0,9935	0,2936	0,7955	0,0309	
<b>FMC7</b>	%, Médiane	0,0001	<0,0001	0,2182	0,0008	0,0002	NA
	MFI, Médiane	0,0035	<0,0001	0,9755	0,0136	0,006	
	RFI, Médiane	0,0015	<0,0001	0,4828	0,0627	0,0023	
<b>CD22</b>	%, Médiane	0,1401	0,0029	0,0162	0,0129	0,2325	<0,0001
	MFI, Médiane	<0,0001	<0,0001	0,2111	0,7923	0,8487	
	RFI, Médiane	<0,0001	<0,0001	0,2423	0,8802	0,8487	
<b>CD27</b>	%, Médiane	0,0753	<0,0001	0,0036	0,4292	0,3528	NA
	MFI, Médiane	<0,0001	0,0001	0,0699	0,9222	0,0203	
	RFI, Médiane	<0,0001	0,0007	0,0668	0,7809	0,0066	
<b>CD13</b>	%, Médiane	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	MFI, Médiane	NA	0,7696	NA	NA	NA	
	RFI, Médiane	NA	0,9426	NA	NA	NA	

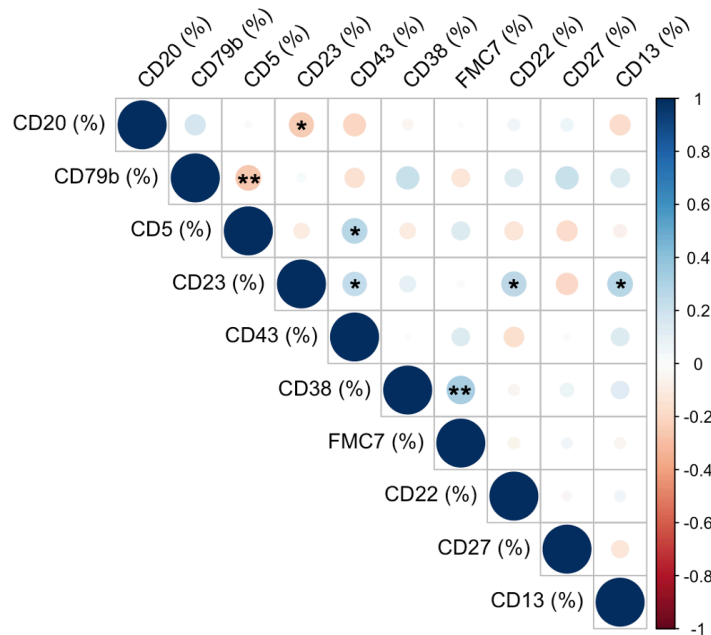
**Annexe 2 : Comparaisons statistiques du groupe MW avec chaque groupe selon les marqueurs phénotypiques.**

Les résultats des comparaisons sont exprimés en p-values.



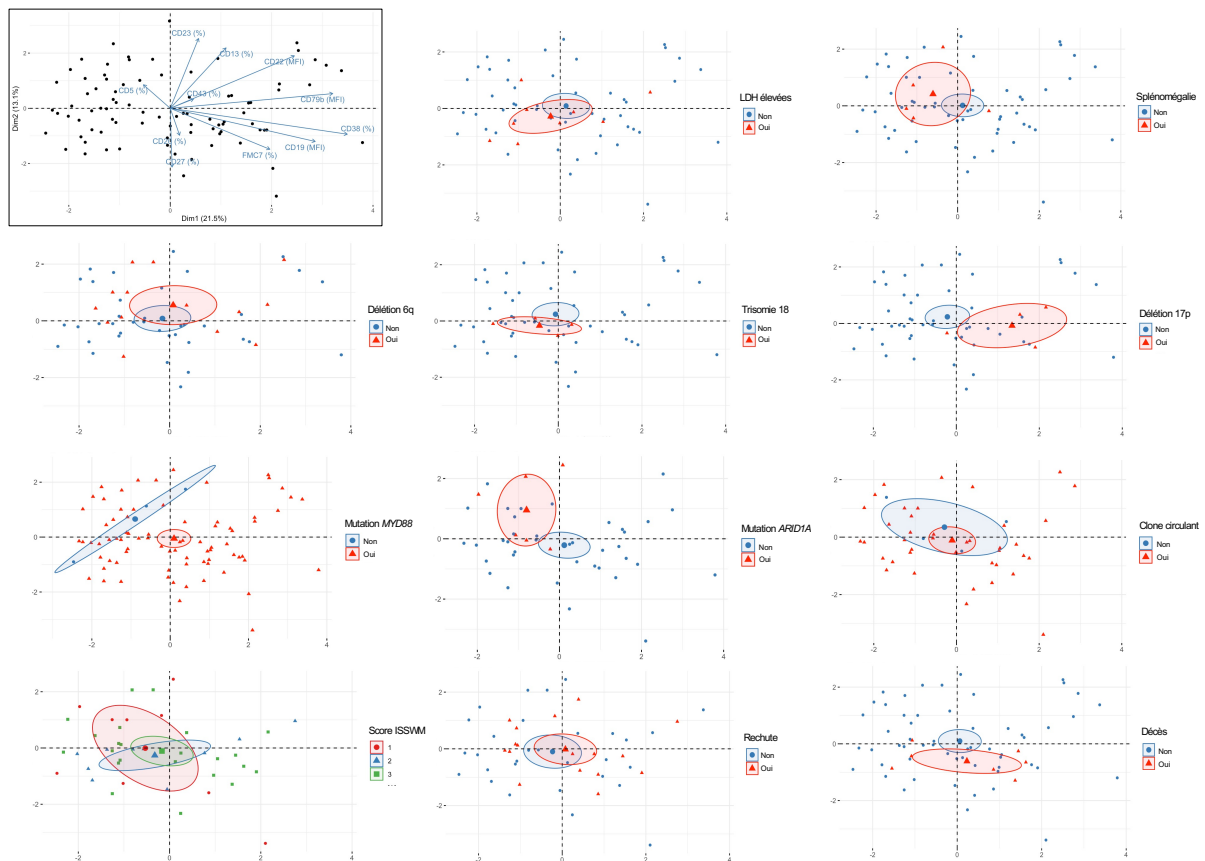
**Annexe 3 : Hétérogénéité des marqueurs phénotypiques dans la MW (n=86).**

A. Pourcentages d'expression selon chaque marqueur phénotypique à la surface des LyB pathologiques de 86 prélèvements médullaires de patients ayant une MW. Chaque ligne représente un patient d'une couleur différente. Les boîtes à moustaches symbolisent la médiane, l'IQ et  $\pm 1,5$  IQ. B. ACP de l'expression en pourcentage du CD5, CD20, CD23, CD43, CD38, FMC7, CD27 et CD13 et des MFI du CD19, CD79b, CD22 à la surface des LyB pathologiques concernant 86 prélèvements médullaires de patients ayant une MW. A gauche, la contribution de chaque paramètre, symbolisé par un vecteur, est représentée par un gradient du vert à l'orange. A droite, distribution des patients selon les paramètres étudiés. La contribution des patients à la variabilité de l'ACP est symbolisée par un point de couleur allant du vert à l'orange.



**Annexe 4 : Corrélation entre les pourcentages d'antigènes étudiés dans la MW (n=86).**

La taille des ronds correspond à la significativité de la corrélation entre deux marqueurs (\* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,01$ ). La couleur des ronds indique le sens de la corrélation entre deux marqueurs d'après l'échelle de couleur à droite du corrélogramme.



**Annexe 5 : Répartition des profils phénotypiques selon certains paramètres clinico-biologiques.** ACP de l'expression en pourcentage du CD5, CD20, CD23, CD43, CD38, FMC7, CD27 et CD13 et des MFI du CD19, CD79b, CD22 à la surface des LyB pathologiques pour 86 prélèvements médullaires de patients ayant une MW. Chaque ellipse de concentration contient 50% des individus.

		<b>CXCR4 NON MUTE (N=52)</b>	<b>CXCR4 MUTE (N=22)</b>	<b>p-value</b>
<b>Hémoglobine</b>	Médiane (g/dL)	11,7	10,7	0,0712
<b>Plaquettes</b>	Médiane (G/L)	265	199	<b>0,0008</b>
<b>Lymphocytes</b>	Médiane (G/L)	1,8	1,7	0,7703
<b>Taux d'IgM</b>	Médiane (g/L)	8,6	21,9	<b>0,0006</b>
<b>CD19</b>	MFI, Médiane [IIQ]	3651 [2726-4807]	2043 [1315-3283]	<b>0,0002</b>
<b>CD79</b>	MFI, Médiane [IIQ]	9605 [5780-14799]	5513 [2237-9990]	<b>0,0076</b>
<b>CD5</b>	Médiane (%)	0,0	0,5	0,9973
<b>CD23</b>	Médiane (%)	7,5	2,8	0,1189
<b>CD43</b>	Médiane (%)	5,0	5,3	0,4943
<b>CD38</b>	Médiane (%)	80,1	15,5	<b>&lt;0,0001</b>
<b>FMC7</b>	Médiane (%)	52,8	22,0	<b>0,0257</b>
<b>CD22</b>	MFI, Médiane [IIQ]	991 [735-1280]	874 [773-1260]	0,4286
<b>CD27</b>	Médiane (%)	47,9	25,4	<b>0,0284</b>
<b>CD13</b>	Médiane (%)	8,9	10,3	0,4421
<b>PLASMOCYTES ESTIMES</b>	Médiane (%)	0,19	0,09	<b>0,0245</b>

**Annexe 6 : Comparaison de paramètres biologiques et phénotypiques selon le statut mutationnel de CXCR4 dans la MW (n=74).**