

# Evaluation du logiciel CovCop dans la LLC

## 1- Introduction

Il existe un grand nombre de facteurs pronostiques dans la leucémie lymphoïde chronique. Il est actuellement indispensable d'étudier avant toute mise en place thérapeutique le statut de *TP53* sur le plan cytogénétique (délétion ou non) et mutationnel. Ceci nécessite la réalisation de plusieurs examens, à savoir un caryotype, de la QMPSF +/- de la FISH en cas d'ininterprétabilité de la QMPSF pour certains loci et du NGS pour la détermination des mutations géniques, en particulier de *TP53*. Afin de simplifier le nombre d'analyses à réaliser et d'optimiser le coût et le délai de rendu des résultats, nous avons voulu tenter de remplacer la QMPSF par le NGS pour la détermination des principales anomalies cytogénétiques de la LLC, à savoir la del(17p), la del(11q), la trisomie 12 et la del(13q).

Pour cela, nous avons collaboré avec l'EA6308 pour mettre au point notre panel de NGS pour la détection de ces anomalies grâce au logiciel Cov'Cop. De plus, nous avons intégré une nouvelle méthode de détection des CNV basée sur l'analyse de la VAF des SNP obtenue par NGS. En effet, en théorie, un SNP hétérozygote est sensé avoir une VAF proche de 50 %. Une déviation de cette valeur peut indiquer une délétion ou une duplication d'un des deux allèles. Nous avons donc mis au point un script utilisable avec le logiciel R permettant la sélection des SNP détectés chez les patients et la construction d'un graphique automatique pour visualisation des résultats.

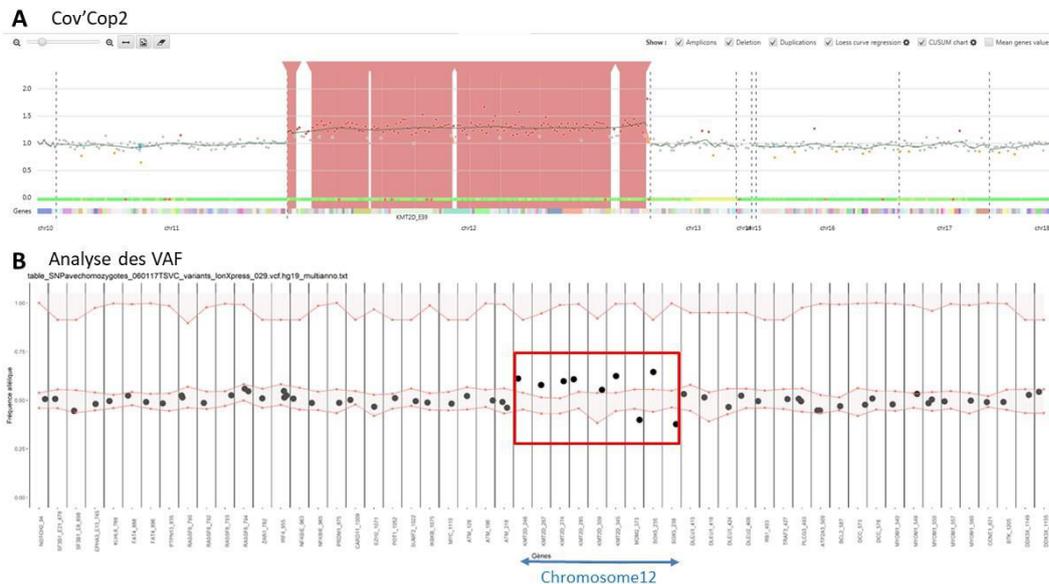
Nous avons testé ces deux approches (Cov'Cop2 et VAF des SNP) sur une cohorte de 82 patients atteints de LLC pour lesquels nous disposons des données concernant ces anomalies par cytogénétique et/ou QMPSF. Nous avons déterminé les performances de cette stratégie en comparaison aux techniques actuellement utilisées, à savoir le caryotype et la FISH et/ou la QMPSF. Enfin, nous avons mis en évidence des anomalies supplémentaires par NGS, non identifiables par cytogénétique (CNV de petite taille, UPD).

## 2- Résultats

Nous avons participé activement à l'amélioration du logiciel Cov'Cop2 pour la détection des CNV (voir article 2, page 203). En particulier, une représentation graphique des résultats générée automatiquement a été intégrée dans cette nouvelle version. Un exemple de visualisation de trisomie 12 est présenté dans la Figure 83-A. Afin d'améliorer les performances analytiques de la détection des CNV par NGS, nous avons également mis au point un algorithme (script R) pour la détection de SNP identifiés par NGS et permettant également la génération automatique d'un graphique représentant les résultats de la VAF en



ordonnée pour chaque SNP, ces-derniers étant regroupés par amplicons, dans l'ordre chromosomique en abscisse. Un exemple de trisomie 12 est présenté dans la Figure 83-B.



**Figure 83 : Visualisation d'une trisomie 12 par le logiciel Cov'Cop2 et l'analyse des VAF.**  
**A-** La trisomie 12 est identifiée par surlignage en rouge. La courbe Loess en vert montre un ratio normalisé augmenté pour l'ensemble des amplicons localisés sur ce chromosome, bien que certains ne soient pas significatifs au seuil choisi (1,15).  
**B-** Le graphique construit sous R représente en abscisse les différents amplicons pour lesquels un SNP a été identifié, rangés du chromosome 1 au chromosome X, et en ordonnée la VAF obtenue par NGS. Les points noirs signifient les SNP identifiés par le script. Les régions gris-rouge au milieu et au-dessus du graphique indiquent les zones de valeurs non significativement différentes de la normale pour des SNP homozygotes (en haut du graphique) ou hétérozygotes (au milieu). Le rectangle rouge encadre les SNP pour lesquels la VAF est significativement anormale. Ceux-ci sont situés au niveau du chromosome 12.

Nous avons ainsi analysé les données de 82 patients atteints de LLC passés en NGS sur notre panel de 70 gènes. Nous avons comparé les résultats obtenus pour les 4 anomalies cytogénétiques principales de la LLC (c'est-à-dire la del(13q), la trisomie 12, la del(11q) et la del(17p)) entre le NGS seul (approches Cov'Cop2 et/ou VAF) et les techniques conventionnelles (cytogénétique et/ou QMPFS). Les résultats sont présentés Figure 84 pour chacune des 4 anomalies cytogénétiques.



### A- NGS : CovCop + VAF

1		del(13q)		2		Trisomie 12	
		NGS				NGS	
		positive	negative			positive	negative
Cytogénétique +/-QMPFSF	positive	38	6	Cytogénétique +/-QMPFSF	positive	9	0
	negative	3	35		negative	0	73
3		del(11q)		4		del(17p)	
		NGS				NGS	
		positive	negative			positive	negative
Cytogénétique +/-QMPFSF	positive	12	5	Cytogénétique +/-QMPFSF	positive	5	4
	negative	3	62		negative	3	70

### B- NGS : CovCop seul

1		del(13q)		2		Trisomie 12	
		NGS				NGS	
		positive	negative			positive	negative
Cytogénétique +/-QMPFSF	positive	35	9	Cytogénétique +/-QMPFSF	positive	9	0
	negative	3	35		negative	0	73
3		del(11q)		4		del(17p)	
		NGS				NGS	
		positive	negative			positive	negative
Cytogénétique +/-QMPFSF	positive	12	5	Cytogénétique +/-QMPFSF	positive	4	5
	negative	0	65		negative	0	73

Figure 84 : Tables de contingence entre l'approche par NGS (Cov'Cop2 et/ou VAF) et techniques conventionnelles.

A- Résultats des CNV sur la base des données NGS avec les 2 approches (Cov'Cop2 et VAF)

B- Résultats des CNV obtenus par NGS avec le logiciel Cov'Cop2 uniquement

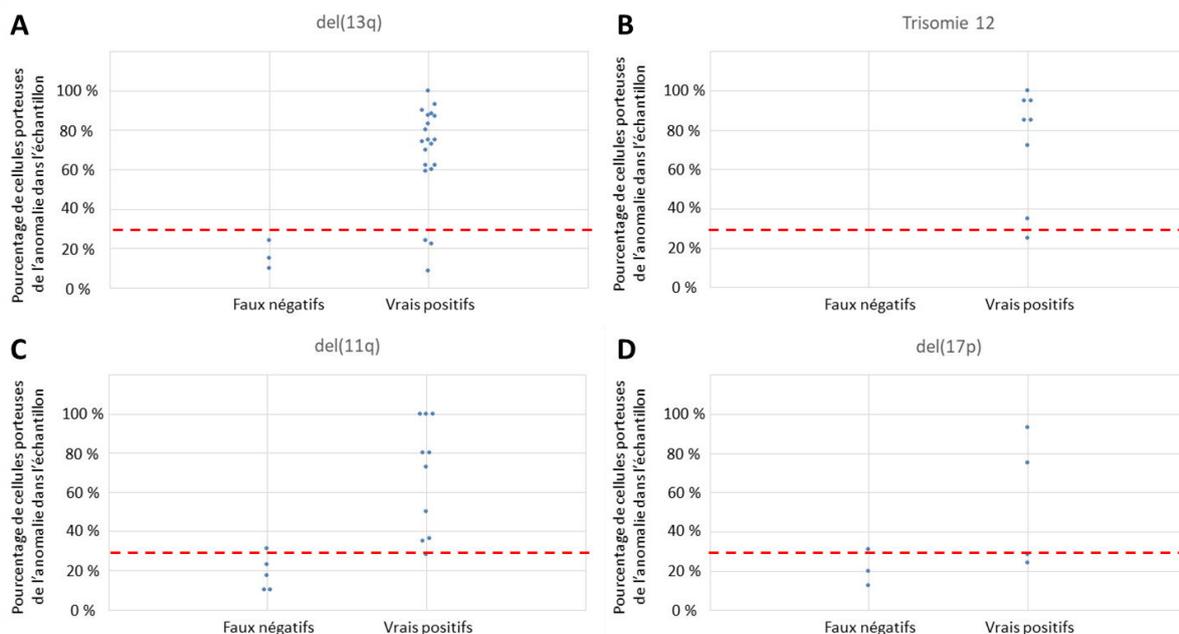
Résultats donnés pour chacune des 4 principales anomalies cytogénétiques de la LLC : la del(13q) (1), la trisomie 12 (2), la del(11q) (3) et la del(17p) (4).

Pour la del(13q), l'approche par NGS entraîne 6 faux négatifs et 9 avec l'approche Cov'Cop seule (Figure 84-1). Les 3 cas non détectés par Cov'Cop2 sont issus de puces enrichies en patients porteurs de del(13q) (n=4 sur les 2 puces concernées) et en l'absence de contrôle sain, pouvant expliquer un manque de sensibilité de l'approche Cov'Cop2. La VAF a alors permis de détecter ces patients. L'approche VAF peut toutefois être en défaut en l'absence de SNP sur la région d'intérêt explorée. Dans le cas de la del(13q), un seul patient parmi les 82 étudiés était non contributif par absence de SNP sur cette région. Enfin, deux cas sont détectés comme positifs pour la del(13q) (délétion de type 1, c'est-à-dire *RB1* conservé), avec le logiciel Cov'Cop2 et l'approche VAF, alors que le caryotype est normal. Pour l'un de ces deux cas, la FISH a été réalisée et est négative, tandis que la QMPFSF est également positive (réalisée sur un prélèvement antérieur). Il s'agit donc d'une délétion de petite taille, non visible par FISH. Dans certains de ces cas, nous disposons des résultats par caryotype et/ou FISH, nous permettant une quantification relative de la présence de l'anomalie parmi les cellules de



l'échantillon. Les résultats montrent un proportion de cellules porteuses de la del(13q) inférieure à 30 % (Figure 85-A), la fréquence la plus élevée étant à 24 %.

La concordance entre les différentes techniques utilisées est parfaite pour la trisomie 12 (Figure 84-2). Les cas de notre série présentent un proportion de cellules porteuses de l'anomalie supérieure ou égale à 25 % (Figure 85-B).



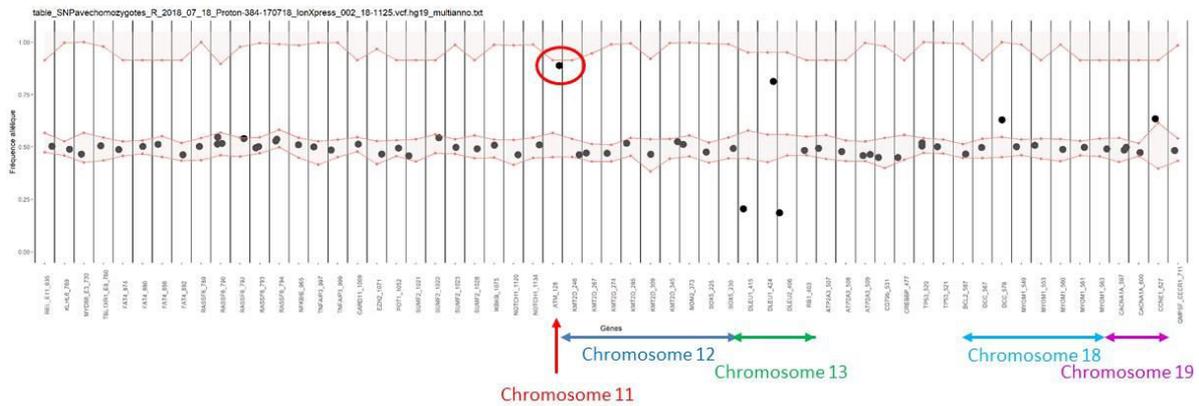
**Figure 85 : Graphiques représentant par anomalie cytogénétique les faux négatifs et vrais positifs par technique NGS par rapport à la technique conventionnelle (cytogénétique +/- QMPSF) selon le pourcentage de cellules porteuses de l'anomalie dans l'échantillon.**

**Les graphiques sont construits pour chaque anomalie cytogénétique principale de la LLC : la del(13q) (A), la trisomie 12 (B), la del(11q) (C) et la del(17p) (D).**

**Le trait pointillé rouge indique le seuil de 30 % de cellules porteuses de l'anomalie.**

Concernant la del(11q), l'approche par NGS entraîne 5 faux négatifs (Figure 84-3). Parmi ceux-ci, la fréquence de l'anomalie la plus élevée est de 31 % (Figure 85-C). La fréquence de cellules tumorales la plus faible permettant de détecter une del(11q) dans notre série est de 28 % par NGS. La technique par NGS détecte également trois cas de del(11q) qui n'avaient pas été détectés initialement par cytogénétique. Dans un premier cas, la détection par l'approche VAF est un faux positif. En effet, le SNP identifié est à la limite du seuil de détection par rapport aux valeurs d'un SNP homozygote (Figure 86).





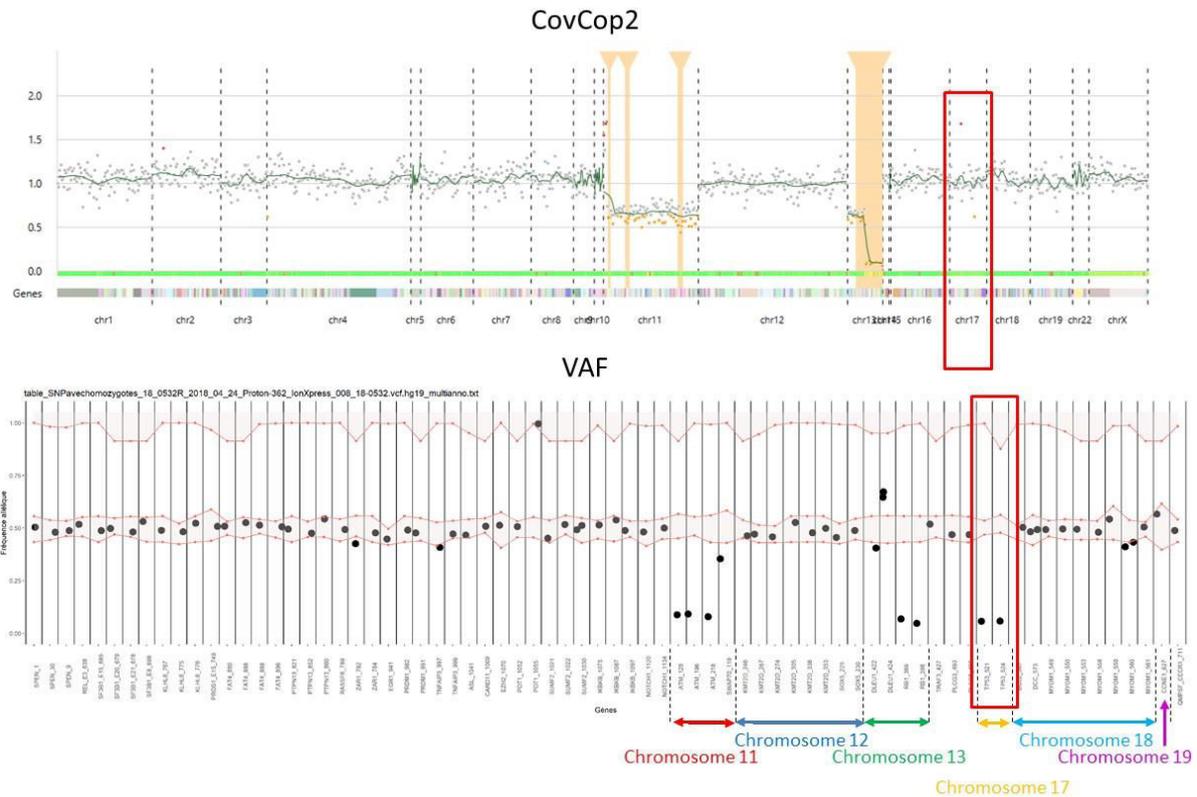
**Figure 86 : Visualisation graphique des VAF des SNP détectés par NGS : cas d'un faux positif pour la del(11q).**

Un seul SNP est retrouvé au niveau d'*ATM* (entouré en rouge). Sa VAF est proche du seuil de normalité d'un SNP homozygote. On observe par ailleurs une del(13q), une anomalie au niveau d'un SNP sur le chromosome 18 et un SNP dont la VAF est à la limite du seuil de normalité pour le chromosome 19. Le caryotype ne montre pas d'anomalie des chromosomes 18 et 19 pour ce patient.

Pour les deux autres cas, la QMPSF avait été réalisée et était négative. Nous avons fait une FISH du locus *ATM* pour l'un des deux patients qui ne détecte pas d'anomalie. Ces cas ne sont détectés qu'avec les VAF. Il s'agit probablement de cas d'UPD, c'est-à-dire que le locus est bien présent en deux exemplaires, mais qu'il existe pour une proportion des cellules une perte d'hétérozygotie par perte d'un allèle et duplication du second (perte d'hétérozygotie à nombre de copies neutre). Ces patients sont par ailleurs porteurs de mutations d'*ATM* (2 mutations avec charge allélique à environ 39 % pour l'un et 1 mutation avec charge allélique à 10 % pour l'autre).

Enfin, pour la del(17p), l'approche par NGS entraîne 4 faux négatifs pour des cas ayant une charge allélique inférieure ou égale à 31 % (Figure 84-4 et Figure 85-D). Un cas n'est détecté qu'avec l'approche VAF. La del(17p) est détectée dans certains cas jusqu'à des proportions de cellules porteuses de l'anomalie de 10 % pour deux cas de notre série. Enfin, trois cas sont détectés comme anormaux par NGS, alors que le caryotype, la FISH et la QMPSF sont normaux pour le locus *TP53*. L'anomalie est détectée par l'approche VAF. Il s'agit probablement de cas d'UPD. Un exemple est présenté Figure 87. Parmi ces trois patients, deux sont mutés pour *TP53* : l'un présente 3 mutations différentes de l'exon 8 avec des charges alléliques à 31 % pour l'une et 3 % pour les 2 autres. L'autre présente une mutation de l'exon 5 avec une charge allélique à 88 %. Dans ce dernier cas, l'UPD entraîne une duplication de l'allèle muté.





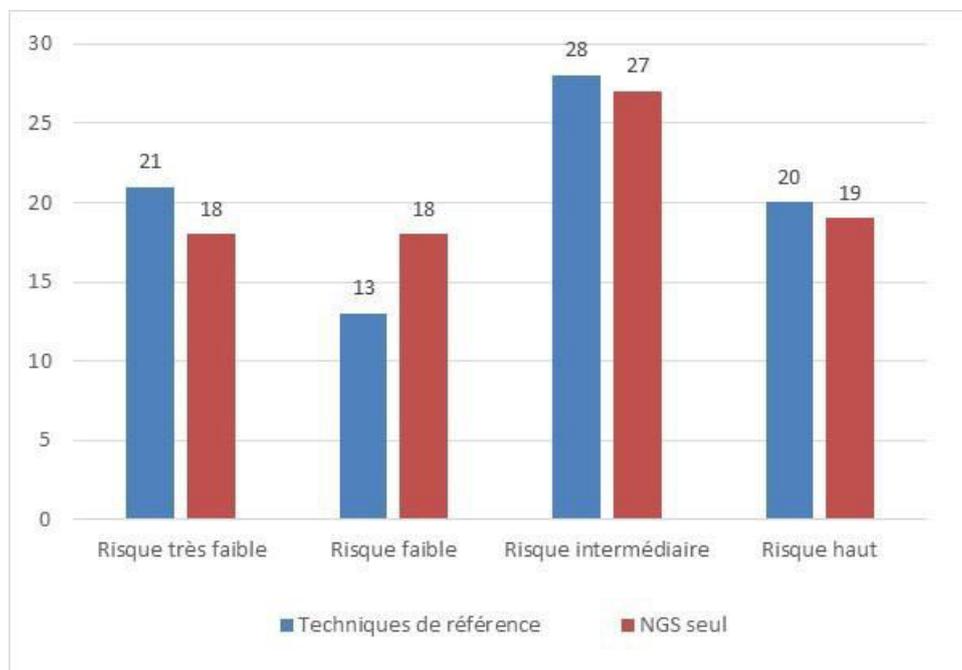
**Figure 87 : Visualisation des graphiques des résultats avec le logiciel CovCop2 et les VAF : exemple d'un cas de disomie uniparentale touchant *TP53*.**  
 Le rectangle rouge entoure la région couvrant le chromosome 17. Aucune anomalie n'est visible avec le logiciel Cov'Cop2 (en haut). Les VAF sont anormales (en bas). On observe également une del(11q) et une del(13q) avec les deux approches. La del(13q) emporte *RB1* et *DLEU2*. Elle est homozygote pour *DLEU2* et hétérozygote pour *RB1*.

Au total, pour ces 4 anomalies, le seuil de sensibilité de la technique de détection des CNV par NGS est estimée autour de 30 %. L'approche VAF permet de détecter quelques anomalies non détectées par Cov'Cop2 (un cas de del(17p) notamment). Cette approche permet par ailleurs de détecter d'autres anomalies non identifiables par cytogénétique ou QMPSF. C'est le cas d'UPD identifiées pour *TP53*, mais aussi pour d'autres gènes tels que *EGR1* ou *EZH2*, bien que leur impact pronostique ne soit pas connu actuellement. De plus, notre panel nous a permis d'identifier d'autres anomalies cytogénétiques d'intérêt pronostique (amplification de *MYC*, délétion 6q...) ou d'impact non connu (délétion hétérozygote de *POT1* avec mutation de l'autre allèle chez un patient ayant un caryotype rendu normal).

Nous avons ensuite étudié l'impact de l'évaluation par approche NGS seule (Cov'Cop2 et VAF) sur le pronostic des patients. Pour cela, nous avons classé les différents cas selon le score de Rossi à partir des données obtenues par techniques conventionnelles d'une part, et par NGS seul d'autre part (Figure 88). La présence de faux négatifs pour la del(13q), la del(17p) et la



del(11q) par NGS entraîne des reclassements pour 11 patients, dont 6 cas étant reclassés vers des catégories de risque inférieur. Ceci est principalement lié à la mauvaise détection de la del(13q), faisant passer 3 patients du groupe de très bon risque vers le groupe de bon risque. Deux cas basculent vers le groupe de risque intermédiaire, l'un étant un faux positif pour la del(11q) par l'approche VAF, et l'autre ayant une probable UPD au niveau d'ATM. La détection d'une probable UPD au niveau de TP53 par la méthode VAF fait passer un cas du groupe de très bon risque vers le groupe de haut risque. Deux del(17p) ne sont pas détectées par NGS et ce qui entraîne le reclassement de ces cas vers le groupe de risque très faible. Enfin, trois del(11q) sont non identifiées par NGS et sont à l'origine du reclassement vers le groupe de risque faible (2 cas) ou de très faible (1 cas). Au total, on observe principalement une augmentation du nombre de patients dans le groupe de risque faible par non détection d'anomalies, et en particulier de la del(13q).

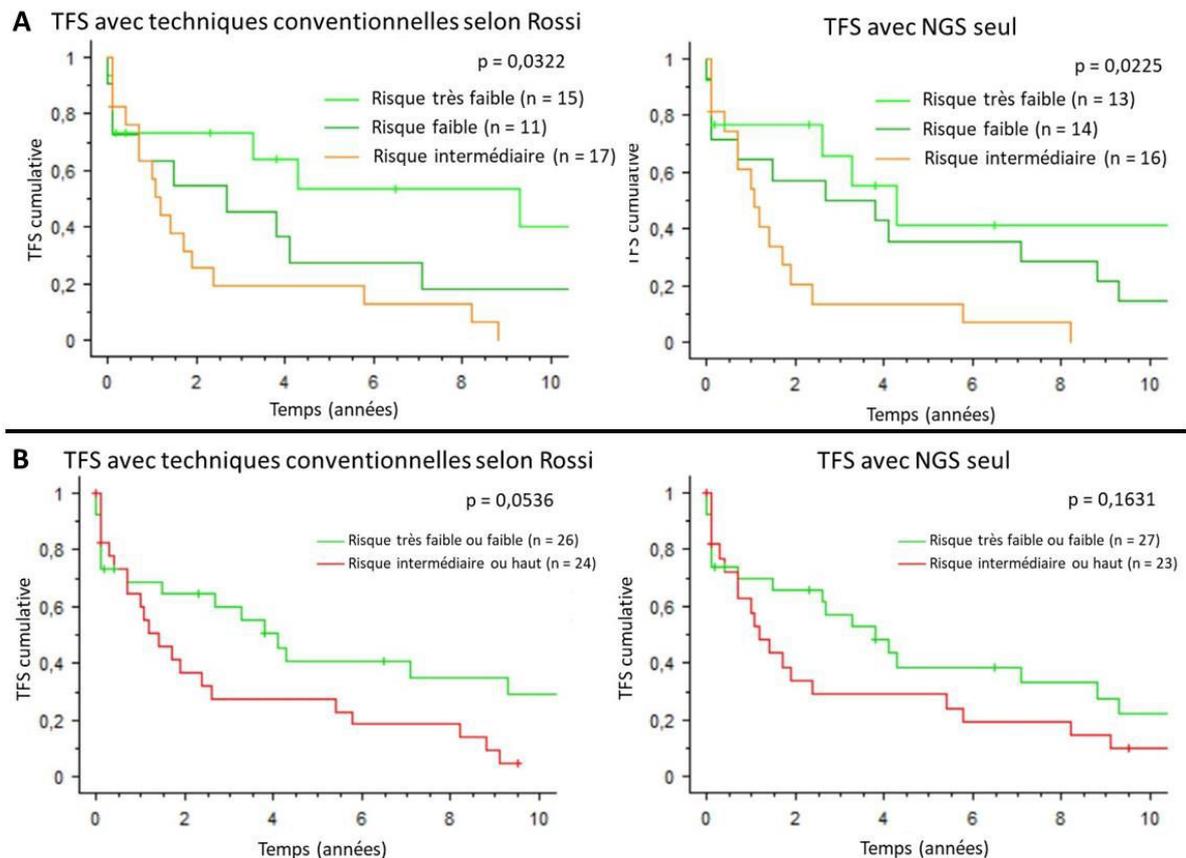


**Figure 88 : Classement des patients selon le score de Rossi à partir de la cytogénétique (en bleu) ou du NGS seul (en rouge) pour la caractérisation de la del(13q), la trisomie 12, la del(11q) et la del(17p).**

A partir de ces données, nous avons regardé l'impact de ces reclassements sur la TFS en fonction du score de Rossi. Nous avons alors sélectionné les patients pour lesquels l'échantillon analysé était prélevé avant tout traitement pour la LLC (soit n = 50). Dans un premier temps nous avons construit des courbes de survie (analyse de Kaplan Meyer pour la TFS) selon les 4 catégories de risque. Le groupe de haut risque comprend 7 patients, quelles que soient les techniques utilisées pour la détermination des CNV. Les résultats obtenus pour



cette catégorie sont aberrants et ne sont pas interprétables compte-tenu du faible nombre de patients. Nous les avons donc exclus de l'analyse en groupes séparés (Figure 89-A). Nous avons ensuite regroupé les catégories de risque faible et très faible d'une part, et de risque intermédiaire et haut d'autre part (Figure 89-B). Les résultats sont non significatifs après regroupement quelle que soit la méthode utilisée pour la détection des CNV, bien que les résultats soient meilleurs (p-value plus faible) en cas de classement avec les techniques conventionnelles.



**Figure 89 : Courbes de survie (TFS) selon le score de Rossi avec classement pour les anomalies cytogénétiques tenant compte des techniques conventionnelles ou du NGS seul.**

**A-** Classement en 4 groupes pronostiques selon le score de Rossi, en tenant compte des résultats des techniques conventionnelles (cytogénétique +/- QMPSF) (à gauche) ou du NGS seul (à droite). Le groupe de risque haut ne comporte que 7 patients et n'est pas contributif. Il a donc été retiré de l'analyse.

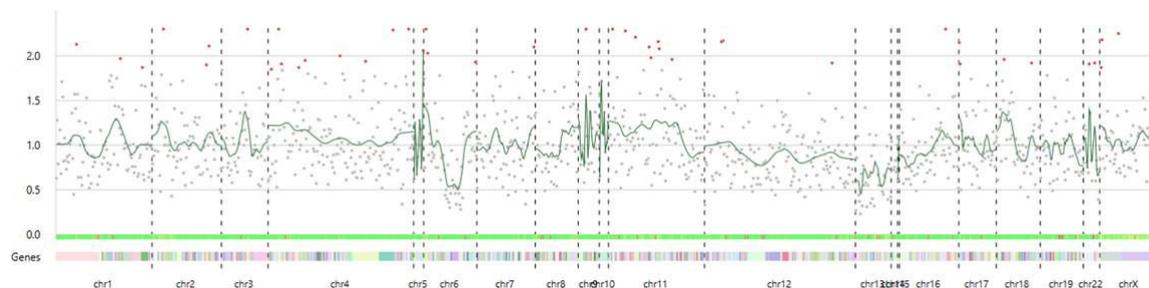
**B-** Classement en 2 groupes pronostiques selon le score de Rossi, avec regroupement des groupes de risque faible et très faible d'une part, et de risque intermédiaire et haut d'autre part. Les anomalies cytogénétiques sont déterminées selon les résultats des techniques conventionnelles (cytogénétique +/- QMPSF) (à gauche) ou du NGS seul (à droite).



### 3- Courte discussion

Dans ce travail, nous avons étudié les performances analytiques du NGS pour la détection des CNV. Nous avons développé un nouvel outil de détection des CNV par NGS basé sur la VAF des SNP. Nous avons combiné l'utilisation cette approche avec le logiciel Cov'Cop2 pour détecter les CNV dans une cohorte de 82 patients atteints de LLC, et nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus par technique de référence, à savoir la cytogénétique (caryotype + FISH).

L'approche par NGS entraîne de faux négatifs pour la del(17p), la del(11q) et la del(13q). Le seuil de sensibilité est estimé à 30 %. Ce seuil est variable selon les anomalies et selon les puces analysées. Par exemple, pour la del(13q), certaines anomalies vont parfois être détectées à des pourcentages de cellules porteuses de l'anomalie de 8,5 %, alors que dans certains cas un pourcentage à 24 % n'est pas suffisant. Le seuil de détection dépend du nombre d'amplicons au niveau de la région d'intérêt et de leur efficacité d'amplification. De plus, malgré l'apport des nouvelles options d'aide à la détection des CNV du logiciel Cov'Cop2, et en particulier l'assignation d'un contrôle sain, certaines anomalies fréquentes telles que la del(13q) peuvent être ininterprétables si la puce contient trop de patients porteurs de l'anomalie. L'analyse est également tributaire de la qualité des librairies, qui, lorsqu'elle est mauvaise, entraîne une grande dispersion des ratios normalisés autour de 1, et rendant ininterprétable la détection d'anomalies par le logiciel Cov'Cop2 (Figure 90).



**Figure 90 : Visualisation avec le logiciel Cov'Cop2 d'un cas ininterprétable avec grande dispersion des ratios normalisés.**

Ce manque de sensibilité peut poser problème pour la détection de la del(17p). En effet, les recommandations actuelles requièrent un seuil de détection à 10 % pour les anomalies de *TP53*<sup>353</sup>. Notre ancienne méthodologie reposait sur un rendu des 4 anomalies cytogénétiques principales basé sur la QMPFS. Cette dernière technique a un seuil de sensibilité de 25 %, ce qui est également insuffisant actuellement<sup>626</sup>. L'approche par NGS est donc valide pour remplacer la QMPFS, mais n'est pas suffisante pour exclure une del(17p) au seuil de 10 %, ceci



étant décisionnel pour la mise en place thérapeutique. La FISH reste alors la technique de référence avec un seuil de sensibilité estimé à 8 % dans notre laboratoire.

Le NGS permet d'identifier les deux types de del(13q), c'est-à-dire entraînant la perte de *RB1* (type 2) ou non (type 1)<sup>371</sup>. Ceci peut être intéressant dans la mesure où le pronostic n'est alors pas le même<sup>370,371</sup>. Il permet également de détecter des délétions de petite taille, parfois non visibles par FISH.

Par ailleurs, l'analyse par NGS détecte dans certains cas une anomalie avec l'approche VAF uniquement, le logiciel Cov'Cop rendant un résultat normal. Il peut alors s'agir d'UPD, sans délétion de *TP53*, et dont la valeur pronostique n'est pas connue. Ces anomalies sont classiquement détectées par technique de SNP-array. Elles ont déjà été identifiées dans la LLC<sup>627-629</sup>. Il a été décrit des cas d'UPD touchant un allèle muté pour *TP53*, ce que entraînerait alors sa duplication et un pronostic semblable à la double inactivation du gène (double mutation ou mutation et délétion)<sup>628</sup>. Ce type d'anomalie serait plus fréquent en cas de LLC de stade avancé<sup>628</sup>. Dans notre série, un patient présente une UPD au niveau de *TP53* détectée par VAF avec duplication de l'allèle muté et une charge allélique de la mutation à 88 %. Il s'agit d'une LLC ré-évolutive 4 ans après traitement par FCR. Des UPD touchant le chromosome 13 en présence de del(13q), en particulier homozygotes, sont décrites dans plusieurs articles<sup>627,629,630</sup>. Leur impact n'est actuellement pas connu. Certains auteurs rapportent des cas impliquant *ATM*<sup>629</sup>. Des UPD d'autres loci sont également décrites. Par exemple, une équipe rapporte un cas où *BCL2* est touché, cette anomalie étant acquise au cours de l'évolution<sup>631</sup>. Par ailleurs, une étude retrouve une association entre l'augmentation du nombre d'UPD et des télomères raccourcis<sup>632</sup>. Un raccourcissement des télomères est susceptible d'entraîner une instabilité chromosomique globale, responsable d'erreurs génétiques par défaut de réparation de l'ADN et aboutissant à des UPD.

Notre technique de détection des CNV par NGS permet la détection d'UPD, ce qui semble être une donnée intéressante. La présence de ces anomalies pourrait être étudiée à l'avenir comme marqueur pronostique, en tant que marqueur global, quel que soit le locus touché, ou en fonction du locus impliqué.

En pratique, actuellement, seul le résultat de la del(17p) a un impact sur la prise en charge thérapeutique des patients. Le NGS est réalisé systématiquement pour la recherche de mutation de *TP53* avant toute mise en place de traitement. La détection d'une mutation de ce gène est alors suffisante pour la prise de décision thérapeutique. En revanche, pour les cas non mutés et en l'absence de détection de del(17p) par NGS ou la détection avec l'approche VAF seule (pouvant indiquer une UPD), la cytogénétique reste nécessaire pour le rendu de résultat.

En conclusion, notre méthode de détection des CNV par NGS permet de remplacer la QMPSF, et de ne réaliser qu'un nombre limité de FISH (cas *TP53* non muté et pour lesquels la del(17p) n'est pas mise en évidence par Cov'Cop2). Elle permet en plus de détecter des CNV de petite taille ainsi que des anomalies potentiellement intéressantes telles que les UPD.



## Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives

Dans ce travail, nous avons tenté de caractériser l'impact des anomalies moléculaires dans l'histoire naturelle de la LLC. Un aspect fondamental de cette thèse concerne la recherche de nouveaux mécanismes oncogéniques via l'étude de trois remaniements impliquant les gènes des immunoglobulines dans la LLC/lymphome lymphocytaire. Une partie plus appliquée aborde le rôle pronostique des immunoglobulines par l'étude de l'électrophorèse des protéines sériques dans la LLC. Pour cela, nous avons développé et amélioré des outils permettant la caractérisation des anomalies de nombre par NGS.

### A- Remaniements atypiques impliquant les gènes des immunoglobulines dans la LLC/lymphome lymphocytaire

Nous nous sommes concentrés sur trois cas de LLC/lymphome lymphocytaire présentant en cytogénétique des translocations originales impliquant les gènes des immunoglobulines et un locus inconnu. Notre étude a permis d'identifier pour chaque dossier les points de cassures et les gènes partenaires. Ceci nous permet de formuler des hypothèses concernant le mécanisme de survenue de ces translocations, ainsi que sur leur potentiel impact dans la pathogénèse.

#### 1- Mécanisme de survenue des remaniements impliquant les gènes des immunoglobulines

##### *a- Mécanismes au niveau du locus des immunoglobulines*

Chacun des trois remaniements identifiés possède des caractéristiques propres et semblent résulter de mécanismes de survenue distincts.

Chez le patient 1, un remaniement entre les chromosomes 14 et 17, impliquant *IGH* avait été mis en évidence. Les points de cassures identifiés dans ce travail impliquent *IGHJ4* et *IGHD4-17*, et sont situés au niveau de RSS. Le mécanisme de survenue du remaniement est très probablement lié à l'activité des enzymes RAG au cours du réarrangement VDJ au niveau du locus *IGH*. Un autre argument en faveur de ce mécanisme est l'insertion de nucléotides pouvant mimer des N-nucléotides au niveau des jonctions. On note dans le cas de la jonction



IGHJ4-chromosome 17 un possible P-nucléotide : on retrouve à ce niveau l'insertion de nucléotides au hasard (chromosome 14-TTTACGATC-chromosome 17), et la première thymine insérée peut correspondre à un P-nucléotide dans la mesure où le nucléotide adjacent tronqué est une adénine.

Dans le cas du patient 2, une translocation entre les chromosomes 17 et 22, impliquant *IGL* avait été identifiée. Le point de cassure est situé au niveau des régions variables d'*IGL*, et touche un gène non fonctionnel (*IGLV3-6*), à distance du RSS. Ces éléments sont des arguments en défaveur d'un mécanisme médié par RAG. En particulier, les points de cassure dans les translocations supposées liées au mécanisme de recombinaison VDJ sont situés directement au niveau du signal. En revanche, un mécanisme lié à AID au cours du processus d'hypermutation somatique est potentiellement en cause. Les arguments en faveur sont la localisation du point de cassure au niveau des régions variables d'*IGL*, l'identification d'un motif CGCG au niveau du point de cassure sur le chromosome 17 et la présence d'une mutation ponctuelle, supposée somatique à proximité du point de cassure au niveau d'*IGL* (G>A dans 1 des 4 séquences lues). Etant donnée la faible couverture au niveau de la base concernée par cette dernière mutation, il pourrait s'agir d'une erreur de séquençage. Cependant, elle est située au niveau d'un motif WGCW suggérant une potentielle cible d'AID et confortant la présence de cette mutation. Le séquençage par Sanger permettra de vérifier la présence celle-ci.

Chez le troisième patient, une translocation impliquant *IGH* et le locus 8q24 avait été identifiée. Le point de cassure au niveau du chromosome 14 se situe dans la région switch d'*IGG2*, au niveau d'une cytidine adjacente à un motif WGCW. Ceci suggère un mécanisme de survenue de la translocation médié par AID au cours de la recombinaison de classe isotypique.

Au total, les mécanismes de survenue de ces trois translocations au niveau du locus des immunoglobulines semblent liés aux enzymes RAG et AID.

### *b- Mécanismes au niveau du gène partenaire*

Chez le patient 1, il n'a pas été mis en évidence de séquence type RSS cryptique pouvant évoquer une implication de RAG ou de séquence WGCW ou CG, cibles d'AID ou encore de motif RGYW, hotspot d'AID pour l'hypermutation somatique, ne permettant pas de suggérer un mécanisme particulier de survenue de la cassure double brin au niveau du chromosome 17. Une implication de RAG dans la survenue de la cassure double brin au niveau du locus d'immunoglobuline étant suspecté, une analyse par ChiP-Seq de l'interaction de ces enzymes avec la région au niveau du chromosome 17 serait intéressante. En effet, il a été montré une interaction possible de RAG avec certaines régions chromatiniennes riches en H3K4me3 (associée à une activation de la transcription) ou directe avec les histones<sup>61</sup>. Il est possible qu'une erreur de recombinaison liée à l'activité de ces enzymes soit en cause. Une autre



hypothèse est qu'il s'agisse de cassures double brin générées de façon non spécifique par d'autres mécanismes (radiations ionisantes, radicaux libres oxygénés...).

Le mécanisme responsable de la cassure double brin au niveau du gène peut être lié à l'action d'AID dans deux cas. Pour la patiente 2, un motif CGCG est retrouvé au niveau du point de cassure sur le chromosome 17, ce qui suggère une implication d'AID au cours de l'hypermutation somatique. Dans le cas du patient 3, le point de cassure au niveau du chromosome 8 est situé à proximité d'un dinucléotide CG, pouvant être un argument en faveur d'un rôle d'AID. Il s'agit probablement dans ces deux cas d'un mécanisme type AID-AID tel que décrit par Lieber *et al.*<sup>47</sup>. Cela signifie que l'enzyme AID est responsable de la survenue de cassure double brin au niveau du gène des immunoglobulines et du gène partenaire.

### *c- Mécanisme de remaniement complexe dans le cas n°1*

Le remaniement observé chez le patient 1 est complexe. Nous pensions initialement qu'il s'agissait d'une translocation. Nos résultats montrent que c'est une insertion complexe d'une portion d'*IGH* dans le chromosome 17. Nous ne connaissons pas exactement le fragment délocalisé. Le mécanisme de survenue semble faire intervenir plus de 3 cassures double brin (au moins au niveau d'*IGHJ4*, *IGHD4-17* sur le chromosome 14 et *B3GNTL1* sur le chromosome 17). Nous pouvons évoquer un processus en plusieurs étapes dans l'apparition de ce remaniement avec par exemple une première translocation au cours du réarrangement VDJ et un ou des remaniements ultérieurs aboutissant à cette insertion complexe. La probabilité de survenue de plusieurs cassures double brin apparaissant de façon successive dans deux régions chromosomiques restreintes semble faible. Un autre mode de survenue proposé est l'apparition de cassures double brin au niveau du chromosome 14 ayant entraîné la formation d'un fragment circularisé (potentiellement au cours du réarrangement VDJ) avec insertion de celui-ci dans le chromosome 17. Enfin un phénomène de chromothripsis est également possible. Afin d'avancer plus dans le mécanisme de cette translocation, il est nécessaire de connaître plus précisément les régions d'*IGH* insérées dans le chromosome 17. Pour cela, nous allons utiliser les données obtenues par séquençage du génome entier et générer de nouveaux alignements (*de novo* et alignements contre référence avec des paramètres de stringence diminués) afin de tenter de visualiser des jonctions chromosome 14-chromosome 14 aberrantes. L'alignement *de novo* risque d'être difficile à analyser étant donnée la structure du gène *IGH* avec de nombreuses régions de séquence très proche. Les éventuels résultats d'intérêt mis en évidence seront confirmés ensuite par PCR standard.



## 2- Mécanisme de dérégulation oncogénique

Une autre question importante est l'impact de ces translocations sur la lymphomagenèse. Les gènes des immunoglobulines contiennent des éléments régulateurs tels que l'enhancer E $\mu$  ou les 3'RR. Leur rapprochement d'un oncogène par translocation peut entraîner la surexpression de celui-ci.

Nous avons vu que dans les cas 2 et 3, des éléments régulateurs sont potentiellement impliqués (enhancer 3'E $\lambda$  et 3'RR1 respectivement). Les translocations sont donc susceptibles d'entraîner la surexpression d'oncogènes au niveau des loci partenaires. Dans les deux cas, les gènes en cause ne sont pas connus. Il s'agit d'*AC139099.4* en 17q25 et *CASC19* en 8q24. Tous deux sont des lncRNA. Le premier est mal connu. Il n'a pas été décrit comme étant impliqué dans des remaniements dans la littérature jusqu'à présent. Sa dérégulation n'est pas rapportée dans les cancers. L'impact potentiel d'une dérégulation de celui-ci est donc difficile à anticiper. Le deuxième est peu décrit. Quelques études rapportent une surexpression dans le cancer colorectal<sup>624,625,633</sup>. Son impact dans la lymphomagenèse n'est pas connu. Le point de cassure se situe au niveau de l'intron 1. La translocation est alors susceptible soit d'entraîner la surexpression de ce lncRNA, soit d'interrompre son expression. Suivant son mode d'action et ses cibles, un rôle dans la lymphomagenèse est possible. Il est également probable que cette translocation entraîne la surexpression d'autres gènes à proximité (gènes situés en amont de *CASC19* sur le dérivé 8 identifié). Un aspect intéressant est la localisation du point de cassure en 8q24. Ce locus correspond à une région de 2 Mb à proximité du gène *MYC*, et est classiquement nommé le « désert de gènes » en raison du faible nombre de gènes fonctionnels annotés dans cette région<sup>634</sup>. Il est connu comme étant parmi les loci les plus fréquemment touchés par des anomalies du nombre de copies dans les cancers<sup>635</sup>. Il contient de nombreux gènes associés à une susceptibilité au cancer tels que *PCAT1* (pour Prostate Cancer Associated Transcript 1) ou *CCAT1* (pour Colon Cancer Associated Transcript 1). Un autre lncRNA localisé dans cette région et situé en aval de *MYC* est impliqué dans des translocations impliquant les gènes des immunoglobulines dans le lymphome de Burkitt. Il s'agit de *PVT1*. Son implication et ses effets dans les cancers sont actuellement intensivement étudiés avec déjà 71 publications répertoriées dans Pubmed parues en 2018 sur le sujet. L'expression de ce lncRNA est corrélée à celle de la protéine *MYC* dans des tumeurs humaines<sup>636</sup>. De plus, des essais *in vitro* d'inhibition de l'expression de *PVT1* par CRISPR-Cas9 (CRISPR pour Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats et Cas9 pour CRISPR-associated protein 9) dans une lignée cellulaire de cancer colorectal dépendant de *MYC* ont été réalisés : ils montrent une diminution du potentiel oncogénique de *MYC* en l'absence de *PVT1*<sup>636</sup>. D'autres essais ont été réalisés par ARN-interférence de *PVT1* sur des lignées cellulaires issues d'hémopathies (myélome, leucémie myéloïde chronique et leucémie aiguë myéloblastique) : les résultats montrent une dégradation de *MYC*, une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose<sup>637</sup>. Ce lncRNA est susceptible de devenir une cible thérapeutique dans les cancers<sup>636,637</sup>. L'identification d'une translocation impliquant *CASC19*, un lncRNA situé dans le locus 8q24, est donc particulièrement intéressante. Un mécanisme d'action semblable à celui de *PVT1* est probable. Une analyse par



RNA-Seq de l'échantillon de ce patient nous permettra d'identifier d'éventuelles surexpressions de ce lncRNA, de *MYC*, mais aussi des autres gènes non codants à proximités tels que *PVT1*. A partir de ces résultats, nous pourrions imaginer des essais permettant de moduler l'expression de *CASC19* pour voir son impact sur l'expression de *MYC* et sur l'apoptose par exemple.

Dans le premier cas, nous ne connaissons pas les éléments régulateurs du gène des immunoglobulines qui sont délocalisés au cours du remaniement. Il est alors plus difficile de formuler des hypothèses sur son effet. Le gène impliqué sur le chromosome 17 est *B3GNTL1*. Il se peut que ce remaniement entraîne une modification des voies de glycosylation dans la cellule. Un aspect intéressant est la proximité du point de cassure identifié dans ce cas avec celui mis en évidence chez la patiente 2, en 17q25. Le gène touché dans le cas 1 (*B3GNTL1*) est situé seulement 200 kb en amont du lncRNA *AC139099.4* impliqué dans le cas 2. Il est possible que, de même que pour le locus 8q24, cette région possède un oncogène particulier avec ARN non codants régulateurs à proximité. On peut imaginer une possible dérégulation de *B3GNTL1* par modification de l'expression d'*AC139099.4*, ce-dernier pouvant avoir un effet stabilisant ou amplificateur de *B3GNTL1*, ou bien à l'inverse inhibiteur. Les lncRNA pouvant avoir de nombreux effets, il se peut qu'une régulation génique d'un oncogène situé à distance soit également en cause. L'analyse par RNA-Seq de l'expression des gènes situés dans ce locus 17q25, en particulier, *B3GNTL1*, *METRNL* et *AC139099.4*, mais aussi de l'expression de l'ensemble du transcriptome nous permettra d'avancer de nouvelles hypothèses sur le mécanisme de dérégulation et le potentiel pouvoir oncogénique de ces remaniements. Enfin, dans l'hypothèse où aucun élément régulateur n'est délocalisé sur le chromosome 17 au cours du remaniement, un autre mode de dérégulation peut être envisagé tel que la disruption d'un gène avec pour conséquence la production d'une protéine tronquée de fonction modifiée ou nulle. Un exemple dans la littérature est celui d'une translocation entre *IGH* et un gène codant une sulfotransférase dans la LLC : ceci entraîne la synthèse de 2 protéines tronquées, aboutissant à une anomalie de distribution cellulaire de celles-ci. La conséquence est une dérégulation d'une voie de signalisation dépendante de cette sulfotransférase et spécifique de la lignée hématopoïétique<sup>382</sup>.

### 3- Modèles de lymphomagénèse

L'apparition des remaniements étudiés semble en relation avec les mécanismes de recombinaison VDJ (cas n°1, au moins en partie), d'hypermutation somatique (cas n°2) et de recombinaison de classe isotypique (cas n°3). Weigert et Weinstock proposent trois modèles de lymphomagénèse (Figure 30)<sup>76</sup>. Le premier correspond à l'acquisition de l'anomalie responsable de la pathologie à un stade unique de différenciation lymphocytaire. Le modèle 2 propose deux étapes, la première survenant aux stades précoces de différenciation, conférant un avantage prolifératif, puis la deuxième à des stades plus tardifs. Enfin, dans le troisième modèle, plusieurs anomalies sont acquises successivement au cours de la



différenciation lymphoïde, la première survenant au stade de progéniteur non engagé dans une lignée. Certaines cellules peuvent conserver des capacités d'auto-renouvellement et constituer des réservoirs pour diversification clonale.

Le cas 1 appartiendrait au modèle 2 dans lequel le remaniement est susceptible d'apparaître au cours du remaniement VDJ au niveau des stades pro-B et pré-B médullaires, puis acquisition de nouvelles anomalies acquises plus tardivement. Ceci est compatible avec la mise en évidence d'une anomalie sous-clonale au caryotype (la t(13;14)). Ainsi, le remaniement d'intérêt serait un événement primaire dans la lymphomagénèse de ce cas, potentiellement associé à l'expansion clonale ou une résistance à l'apoptose. Ceci est cohérent avec la clinique observée chez ce patient, plutôt indolente, sans nécessité de mise en place thérapeutique.

Le cas n°2 serait quant à lui à relier au modèle 1, avec acquisition de l'anomalie au stade centre germinatif. Il s'agirait là encore d'un événement primaire. Cette anomalie est probablement associée à l'expansion clonale et la prolifération. Après deux lignes de traitement successives, la patiente est actuellement en abstention thérapeutique depuis plus de deux ans.

Enfin, le cas n°3 est supposé apparaître au cours de la recombinaison de classe, au stade centre germinatif. Il pourrait être apparenté au modèle 3 dans la mesure où plusieurs clones différents sont identifiés au diagnostic, tous ne présentant pas la t(8;14). On peut imaginer l'apparition d'anomalies à des stades plus précoces, et le remaniement impliquant le gène des immunoglobulines serait un événement secondaire acquis au stade centre germinatif. Il est toutefois intéressant de noter que le clone porteur de ce remaniement semble sélectionné au cours du temps, après chimiothérapie. Il s'agirait donc d'une anomalie associée à la prolifération, potentiellement impliquée dans l'agressivité de la LLC chez cette patiente.

#### 4- Perspectives

Ce travail a permis d'identifier les points de cassures pour 3 remaniements atypiques impliquant les gènes des immunoglobulines. Il ouvre de grandes perspectives dans la découverte de nouveaux mécanismes de dérégulation génique, en particulier avec l'implication de lncRNA. Ces derniers, initialement peu explorés à cause de leur caractère non codant, sont particulièrement étudiés à l'heure actuelle grâce au développement des nouvelles techniques de séquençage haut débit, et semblent prometteurs dans la compréhension des mécanismes de régulation génique, en particulier dans les cancers et la lymphomagénèse. Cependant, il reste encore de nombreux aspects à éclaircir. En premier lieu, l'étude d'expression génique par RNA-Seq nous permettra de formuler des hypothèses plus avancées sur le mode de dérégulation produit par ces remaniements, et d'envisager de nouvelles expériences à mener pour expliquer leur rôle dans la lymphomagénèse. Il est possible que, comme PVT1, de nouvelles cibles thérapeutiques puissent être identifiées.



Par ailleurs, le remaniement du premier patient n'a pu être détecté initialement que par FISH. Il s'agit d'une anomalie cryptique au caryotype. Il est donc possible que ce type d'anomalie soit plus fréquent dans la mesure où l'analyse par FISH des loci des immunoglobulines n'est pas systématiquement réalisée. Il serait intéressant de dépister de nouveaux cas de lymphomes afin d'identifier des remaniements impliquant les loci 17q25 ou 8q24 en amont de *MYC*, ou encore de nouveaux loci non précédemment identifiés.

## B- Impact pronostique de l'électrophorèse des protéines sériques dans la LLC

Avec l'avènement du NGS, de nombreuses mutations géniques ont été mises en évidence dans la LLC à des fréquences plus ou moins importantes. Les anomalies récurrentes telles que celles affectant *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* ou *BIRC3* ont été étudiées dans des séries de patients et leur impact pronostique péjoratif a pu être mis en évidence<sup>360,361,422,445,446,448</sup>. L'apparition d'un nombre important de nouveaux marqueurs pronostiques moléculaires dans la LLC rend de plus en plus complexe l'analyse et un score intégrant ces différentes variables reste à établir. Récemment, un nouveau score a été proposé : le CLL-IPI. Celui-ci ne prend en compte sur le plan moléculaire que le statut mutationnel *IGHV* et de *TP53*<sup>497</sup>. L'intégration de l'ensemble de ces nouveaux marqueurs semble difficile sur le plan pratique et seuls ceux ayant un impact suffisamment fort sont donc utilisés. En pratique, aucun de ces marqueurs pronostiques moléculaires ne constitue en lui-même une indication de traitement.

Nous avons étudié dans ce travail un marqueur sérique habituellement analysé au diagnostic et au cours du suivi dans la LLC : il s'agit de l'électrophorèse des protéines sériques. L'impact pronostique d'une électrophorèse des protéines sérique normale n'a pas été étudié jusqu'ici dans la littérature, l'hypogammaglobulinémie et/ou la présence d'un composant monoclonal, évalués par différentes techniques, ayant été débattus comme marqueurs pronostiques<sup>327,457,504-509</sup>. Nous avons donc analysé l'impact d'une électrophorèse des protéines sériques normale (c'est-à-dire immunoglobulines polyclonales sans hypogammaglobulinémie) versus anormale au diagnostic dans la LLC. L'intérêt de ce marqueur est sa simplicité de mesure et son moindre coût. Nous avons pu montrer qu'une électrophorèse des protéines sérique normale permet d'identifier des patients avec un bon pronostic. Elle est associée au stade Binet A et à une lymphocytose au diagnostic inférieure à 30 G/L. La combinaison de ce marqueur avec le statut *IGHV* muté permet d'identifier une population particulière de patients ayant une survie sans traitement significativement plus longue que les autres cas de LLC, et qui ne nécessiteront probablement jamais de traitement spécifique de cette maladie.

L'électrophorèse des protéines sériques anormale serait en fait un marqueur d'évolutivité. L'hypogammaglobulinémie peut survenir d'emblée ou apparaître lors du suivi. Elle pourrait



être attribuable à un déficit fonctionnel des lymphocytes B CD5- n'appartenant pas au clone de la LLC<sup>638</sup>. Les sous-types IgG3 et IgG4 sont les plus touchés. La présence d'un pic monoclonal peut quant à elle être attribuable à une sécrétion par le clone de LLC. Cependant, il existe des cas pour lesquels une discordance est observée concernant l'isotype de la chaîne légère (Kappa ou Lambda) exprimée par le clone de LLC, identifiée par cytométrie en flux et celle de l'immunoglobuline monoclonale retrouvée au niveau sérique. Ceci serait observable dans 34 % des cas<sup>639</sup>. Elle pourrait alors être sécrétée par des lymphocytes B n'appartenant pas au clone et être un reflet de l'activité du microenvironnement.

En conclusion, l'électrophorèse des protéines sériques fournit des informations intéressantes non seulement par la détection des patients présentant une hypogammaglobulinémie et donc à risque de développer des infections, mais aussi sur le plan pronostique, permettant d'identifier un groupe de patients avec une évolution favorable lorsqu'elle est normale au diagnostic, en particulier en association à un statut IGHV muté. Ceci reste valable dans l'ère du séquençage haut débit.

## C- Utilisation du séquençage haut débit pour la détection d'anomalies de nombre

Nous avons mis au point un panel de séquençage haut débit par amplicons permettant l'identification des principales mutations récurrentes décrites dans les lymphomes. Nous avons développé ce panel afin de pouvoir également détecter les principales anomalies de nombre de la LLC : la del(13q), la trisomie 12, la del(11q) et la del(17p). Nous avons collaboré avec l'EA6308 afin d'améliorer le logiciel Cov'Cop développé initialement pour l'identification de CNV dans les maladies héréditaires<sup>606</sup>. Diverses options ont été intégrées afin de faciliter la détection des CNV, en particulier dans les cas où l'anomalie peut être présente dans une minorité de cellules dans l'échantillon analysé (mosaïques de certaines pathologies constitutionnelles ou cas des tumeurs avec infiltration partielle et/ou anomalies sous-clonales). Une amélioration majeure est la construction automatique d'un graphique représentant les ratios normalisés de chaque amplicon dans l'ordre chromosomique permettant l'analyse rapide des résultats. De plus, il est maintenant possible d'assigner un ou plusieurs contrôles sains dans l'analyse, ce qui permet d'améliorer la stabilité de certaines régions pouvant être fréquemment anormales, comme c'est le cas avec la del(13q) dans la LLC.

L'analyse de nos résultats obtenus par NGS concernant les mutations nous a permis d'identifier une bonne stabilité de la VAF d'un certain nombre de SNP avec des valeurs très proches de 50 % en cas d'hétérozygotie. Nous avons donc voulu utiliser ces résultats pour détecter la présence de CNV. Pour cela, nous avons développé un script utilisable avec le logiciel R, permettant de sélectionner automatiquement les SNP d'un échantillon et de



représenter leur VAF graphiquement. Nous avons évalué les performances analytiques du NGS en combinant l'utilisation du logiciel Cov'Cop2 et l'analyse des VAF de SNP dans une série de 82 patients atteints de LLC, en comparaison à la technique de référence (cytogénétique et/ou QMPSF). Nos résultats nous permettent d'estimer un seuil de sensibilité à 30 %. Certaines anomalies peuvent être détectées avec un pourcentage de cellules porteuses de l'anomalie dans l'échantillon inférieur à ce seuil. La qualité de la librairie est primordiale pour une bonne interprétation des résultats. En effet, en cas de mauvaise qualité, les ratios obtenus sont très dispersés et les anomalies sont alors difficilement interprétables.

L'approche VAF peut permettre de détecter des anomalies initialement non identifiées avec le logiciel Cov'Cop2 et d'améliorer la sensibilité de l'analyse. Cependant, elle détecte également de probables UPD dont la significations pronostique au niveau de *TP53* et *ATM* reste discutable en l'absence de mutation de ces gènes. Nous avons donc décidé de vérifier par FISH ces CNV lorsqu'ils ne sont identifiés que par VAF, et non par Cov'Cop2.

Nous avons classé les patients en groupes pronostiques selon le score de Rossi à partir des données du NGS seul ou des résultats des techniques conventionnelles (cytogénétiques et/ou QMPSF)<sup>361</sup>. Malgré un manque de sensibilité de notre technique pour la détection de certains CNV (del(13q), del(11q) et del(17p)), nous montrons que l'impact sur la survie sans traitement est peu marqué pour les patients de notre série.

Dans ce travail, nous avons privilégié une bonne spécificité, le seuil de sensibilité de 30 % étant insuffisant pour exclure une délétion de *TP53* selon les recommandations actuelles<sup>353</sup>. Ainsi, notre approche de détection des CNV par NGS permet de remplacer l'analyse par QMPSF dont la sensibilité à 25 % est également insuffisante dans ce contexte<sup>626</sup>. Elle ne permet pas en revanche de s'affranchir totalement de l'analyse par FISH, dont le seuil est estimé à 8 % dans notre laboratoire pour le locus *TP53*, demeurant la technique de référence. Notre approche par NGS permet de diminuer le nombre d'analyses par FISH, en réservant son utilisation à la détection de la del(17p) lorsque celle-ci n'est pas détectable par NGS et en l'absence de mutation de *TP53*.

La détection d'UPD par cette technique est intéressante. La présence d'UPD peut permettre de dupliquer un allèle muté et entraîner la double inactivation d'un gène, comme par exemple pour *TP53*<sup>628</sup>. Un cas de notre série est concerné. Il s'agit donc d'une donnée intéressante. En revanche la valeur pronostique de ce type d'anomalie en l'absence de mutation est inconnu. Certains auteurs ont rapporté un lien entre le nombre d'UPD et un raccourcissement des télomères responsable d'une instabilité chromosomique globale<sup>632</sup>. Ainsi, la détermination de la présence d'UPD pourrait être un reflet de l'instabilité chromosomique dans la LLC, à l'origine d'accumulation d'erreurs génétiques par défaut de réparation de l'ADN. Il serait intéressant de regarder l'impact pronostique des UPD dans la LLC, soit de façon ciblée (par exemple UPD de *TP53* avec mutation concomitante ou non) ou de façon globale : présence ou non d'UPD quelque soit le locus touché. Cependant, notre approche par NGS ne permet de détecter que certaines UPD ciblées par notre panel de 70 gènes et l'étude de l'impact des UPD dans la LLC en tant qu'altération globale devrait être analysée par SNP-array.





## Conclusion

La question posée était celle du poids des anomalies moléculaires et en particulier des gènes des immunoglobulines dans l'histoire naturelle de la LLC, tant pour le développement de la maladie que pour son pronostic.

Au plan mécanistique, ce travail de thèse a permis de déterminer les points de cassure de trois remaniements des loci des immunoglobulines atypiques dans la LLC/lymphome lymphocytaire. Il met en évidence dans deux cas l'implication de lncRNA (cas 2 et 3). Il ouvre donc la voie pour l'étude de ceux-ci et de leurs gènes cibles dans la LLC. Deux cas ont également des points de cassure dans une région chromosomique proche (espacés de seulement 200 kb en 17q25 pour les cas 1 et 2) et il pourrait s'agir d'une région importante dans la lymphomagenèse, de même que pour la région 8q24 contenant *MYC* et de nombreux gènes non codants jusqu'ici peu explorés. Enfin, un de nos remaniements est cryptique au caryotype et démontre l'importance d'une analyse systématique par FISH pour les loci des immunoglobulines pour la détection de nouveaux remaniements atypiques apparentés ou non dans les lymphomes B.

D'un point de vue pronostique, nous avons démontré qu'un marqueur simple et peu coûteux reste, dans l'ère du NGS, un marqueur pronostique fort dans la LLC. Il s'agit de l'électrophorèse des protéines sériques qui, lorsqu'elle est normale (c'est-à-dire immunoglobulines polyclonales sans hypogammaglobulinémie) au diagnostic, permet d'identifier des patients avec une excellente survie sans traitement. En particulier, la combinaison de ce marqueur avec un statut IGHV muté permet d'identifier des cas de LLC qui n'auront probablement jamais besoin d'un traitement spécifique de leur hémopathie.

De façon connexe, nous avons mis au point un outil de détection des CNV par NGS performant. Malgré un manque de sensibilité, il permet de simplifier l'analyse génétique des cas de LLC au laboratoire. Il est capable également de détecter des UPD dont la signification pronostique n'est actuellement pas établie. Ceci pourrait être un marqueur d'instabilité génétique et avoir un impact pronostique qu'il serait intéressant d'étudier.

