

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 524 Biologie Santé

FACULTE des Sciences et Techniques

Equipe de recherche UMR CNRS 7274

Thèse N° [72-2012]

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : biologie santé

Présentée et soutenue par

Nathalie GACHARD

le 20 décembre 2012

Etude moléculaire des lymphomes B indolents : exemple des lymphomes de la zone marginale et de la maladie de Waldenström

Thèse dirigée par Jean Feuillard

JURY :

Président de jury

M. Michel Cogné

Rapporteurs

M. Christian Bastard

M. Frédéric Davi

Examineur

M. Arnaud Jaccard

Directeur de thèse

M. Jean Feuillard

Dédicace

A mon mari, Franck

J'ai beaucoup de chance de t'avoir à mes côtés

Merci pour ta patience à me laisser travailler des heures

Merci pour avoir assumé tout le reste

Merci pour tout ce que tu m'apportes dans la vie

Remerciements

Merci à Jean, mon directeur de thèse, pour m'avoir encadrée et soutenue sans faillir jusqu'à la fin.

Merci à Dominique Bordessoule qui est toujours présente, surtout dans les moments difficiles.

Merci à Michel Cogné pour sa disponibilité continue, ses discussions intéressantes et la présidence de ce jury.

Merci à mes rapporteurs, Frédéric Davi pour son honnêteté intellectuelle et Christian Bastard pour sa générosité, ses conseils avisés et son accueil au sein de son équipe lorsque cela s'est avéré nécessaire pour moi.

Merci à mon examinateur Arnaud Jaccard avec qui j'ai eu plaisir à travailler sur une autre thématique.

Milles fois merci à Mélanie, qui connaît aussi bien que moi les séquences des gènes IGHV, pour sa compétence, discrétion et disponibilité.

Un grand merci à Marie-Pierre, sans qui le dernier article n'aurait pas abouti, pour son enthousiasme, son efficacité et son savoir-faire.

Merci à Abdel, capable de concevoir des outils personnalisés, pour son aide précieuse, sa gentillesse.

Merci à mes pathologistes préférées, Marie, Isabelle, Barbara et Manuela qui sont à la base de ce travail car la caractérisation fiable des cas est le pré-requis qui a fait ressortir les résultats. Leur disponibilité et leur enthousiasme m'ont soutenue dans cette preuve.

Merci à Joel qui assure la gestion de nos projets de recherche avec une fiabilité et une qualité hors pair.

Merci à Emilie qui m'a aidée simplement et efficacement dans l'urgence.

Merci à Brigitte qui est une relectrice sans faille.

Merci à toutes les techniciennes de mes secteurs qui m'ont aidé indirectement en s'adaptant à mes indisponibilités et ont pallié le plus possible à mes absences.

Merci à David qui m'a remplacé sans difficulté bien que lui aussi soit très occupé.

Merci à Estelle qui a spontanément assuré la transmission des informations tant au niveau clinique qu'à la paillasse afin d'assurer la prise en charge des dossiers urgents ou difficiles.

Merci aux cliniciens qui, pour la plupart, ont été patients pour avoir une réponse à leurs questionnements et ne se sont jamais plaints de mon indisponibilité.

Merci à Nathalie, toujours à l'écoute, avec qui je suis souvent sur la même longueur d'onde et qui me montre, tout naturellement, les choses sur un autre angle.

Merci à toute l'équipe du deuxième qui a été présente dans la dernière ligne droite.

Merci à Eric pour ses discussions - explications sur des mécanismes physiologiques dont la compréhension était indispensable à ce projet.

Liste des Abréviations

ABCB1 : ATP-Binding Cassette sub-family B member 1

AID : Activation Induced Deaminase

APE : Apurinic/Apyrimidic Endonuclease

APOBEC : Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like

BALT : Bronchial-Associated lymphoid Tissue

BCR : récepteur de la cellule B (B Cell Receptor)

BER : Base Excision Repair

BL : lymphome de Burkitt (Burkitt Lymphoma)

CD : Cluster de Différenciation

CDF : Cellule Folliculaire Dendritique

CDR : Complementary Determining Region

CMV : CytomégaloVirus

CSR : Class Switch Recombination

CXCL : Chemokine (C-X-C motif) Ligand

CXCR : Chemokine (C-X-C motif) Receptor

DC1 : Cellules Dendritique de type 1

DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules (Diffuse Large B cell Lymphoma)

DLBCL-ABC : lymphome B diffus à grandes cellules de type activé (activated B-cell-like)

DLBCL-GC : lymphome B diffus à grandes cellules de type centre germinatif (germinal centre B-cell-like)

EBV : Epstein-Barr virus

EGIL : European Group for Immunophenotyping Leukemia

FCL : lymphome folliculaire (Follicular cell Lymphoma)

FR : Framework Regions

GALT : Gut-Associated lymphoid Tissue

HCL : leucémie à tricholeucocytes (Hairy Cell Leukemia)

HCL-v : leucémie à tricholeucocytes variante

HCV : Virus de l'Hépatite C

HHV-8 : Human Herpes Virus 8

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HTLV-1 : Human T Lymphotropic Virus 1

Ig : Immunoglobuline

IgH : chaîne lourde de l'immunoglobuline (Heavy)
IgL : chaîne légère de l'immunoglobuline (Light)
IL : InterLeukine
IMGT[®] : International ImMunoGeneTics information system[®]
IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4
LCR : Locus Control Region
LDH : Lactate Déshydrogénase
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
LPL/WM : lymphome lymphoplasmocytaire/ maladie de Waldenström (LymphoPlasmacytic Lymphoma)
MALT : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MAR : Matrix Attachment Region
MCL : lymphome du manteau (Mantle Zone Lymphoma)
MMR : MisMatch Repair
MYD88 : MYeloid Differentiation primary response 88
MZL : lymphome de la zone marginale (Marginal Zone Lymphoma)
NALT : Nasal-associated lymphoïd Tissu
NAS : Nonsense-associated Altered Splicing
NHEJ : Non Homologous End Joining
NMD : Nonsense-Mediated mRNA Decay
NMUP : Nonsense-Mediated Upregulation of Pre-mRNA
NMZL : lymphome ganglionnaire de la zone marginale
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
RAG : Recombination Activation Gene
RFLP : restriction fragment length polymorphism
RSS : Recombination Signal Sequence
SMZL : lymphome splénique de la zone marginale (Splenic Marginal Zone Lymphoma)
SRPL : lymphome de la pulpe rouge splénique (Splenic Diffuse Red Pulp Small B-cell Lymphoma)
TdT : Terminal deoxynucléotide Transférase
TIR : domaine Toll/Interleukine 1 Récepteur
TMA : Tissu Micro Array
TLR : Toll Like Receptor

UNG : Uracil DNA glycosylase

UTR : UnTranslated Region

VHC : Virus de l'Hépatite C

Sommaire

<i>Préambule</i>	1
<i>Chapitre 1 : Physiologie de la différenciation lymphocytaire B et des remaniements des gènes des immunoglobulines</i>	3
Physiologie de la maturation des gènes des immunoglobulines de la réponse immune B	4
1. Généralités sur les immunoglobulines humaines	4
2. Réarrangement des gènes des immunoglobulines dans la moelle osseuse	10
3. La transduction de signal via le BCR, et les principaux co-signaux associés à la maturation B post-médullaire	23
4. Maturation lymphocytaire B post-médullaire	26
<i>Chapitre 2 : Relation entre altérations des gènes des immunoglobulines et lymphomagénèse B</i>	47
Accident de recombinaison des gènes des immunoglobulines, dérégulation et mutations d'oncogènes et lymphomes B périphériques	48
Le Répertoire <i>IGHV</i> dans les lymphomes	54
1. L'exemple de la LLC	54
2. L'exemple du LNH du manteau	58
3. L'exemple des lymphomes du MALT	59
4. L'exemple de l'infection par le VHC	60
<i>Chapitre 3 : les lymphomes de la zone marginale non MALT et le lymphome lymphoplasmocytaire/maladie de Waldenström</i>	64
Les lymphomes spléniques de la zone marginale	65
Epidémiologie	65
Présentation clinique	65
Diagnostic	66
Cytologie sanguine	67
Immunophénotype sanguin ou médullaire	67
Myélogramme	68
Biopsie ostéo-médullaire	68
Histologie splénique	69
Cytogénétique et anomalies moléculaires	70
Le statut mutationnel de la région variable des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobuline (<i>IGHV</i>)	72
Diagnostic différentiel	74
Les lymphomes ganglionnaires de la zone marginale	76
Epidémiologie	76
Présentation clinique	76
Histologie ganglionnaire et médullaire	77
Immunophénotype	78
Cytogénétique et anomalies moléculaires	78
Le statut mutationnel des <i>IGHV</i>	80
Lymphome lymphoplasmocytaire / maladie de Waldenström	81
Epidémiologie	81
Présentation clinique	81
Hémogramme	83

Biopsie ostéomédullaire et myélogramme	83
Atteintes extra-médullaires	84
Immunophénotype et Immunohistochimie.....	85
Cytogénétique et anomalies moléculaires	85
Le statut mutationnel des <i>IGHV</i>	87
<i>Chapitre 4 : Objectifs du travail</i>	88
<i>Chapitre 5 : Méthodologie utilisée pour l'analyse des séquences IGHV humaines</i>	90
Extraction des acides nucléiques.....	91
Amplification	92
Séquençage.....	93
Analyse de séquences.....	94
<i>Chapitre 6 : Les articles de la thèse</i>	99
Publication N°1 : Splenic marginal zone lymphomas and lymphoplasmacytic lymphomas originate from B-cell compartments with two antigen exposure histories (2008).....	100
Contexte	100
Question posée	102
Résumé.....	102
Article 103	
Discussion de l'article	107
Publication N°2 : <i>IGHV</i> gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström Macroglobulinemia / lymphoplasmacytic lymphomas	109
Contexte	109
Question posée	111
Résumé.....	111
Article	113
Discussion de l'article	119
<i>Chapitre 7 : Discussion</i>	124
<i>Chapitre 8 : Conclusion et perspectives</i>	132
<i>Bibliographie</i>	135
<i>Annexes</i>	154

Préambule

Dans la classification de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) de 2008, les lymphomes de la zone marginale (MZL) regroupent des néoplasies B ayant des caractéristiques morphologiques et pathologiques communes. Ils comportent 3 sous-types selon le territoire infiltré lors de la présentation : les lymphomes spléniques de la zone marginale (SMZL), les lymphomes ganglionnaires de la zone marginale (NMZL) et les lymphomes des tissus lymphoïdes liés aux muqueuses ou lymphomes du MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) (1). Une des questions récurrentes dans la littérature est celle du diagnostic différentiel avec les autres lymphomes indolents, et notamment le lymphome lymphoplasmocytaire/ maladie de Waldenström (LPL/WM), qui partage des caractéristiques communes avec les MZL.

Le lymphome du MALT constitue une entité bien caractérisée cliniquement et biologiquement que nous ne décrivons pas car ce lymphome présente une physiopathologie un peu particulière par rapport aux autres lymphomes de la zone marginale. Le cadre nosologique des deux MZL non MALT et du LPL/WM est très discuté et correspond à la thématique du laboratoire depuis 2004.

Après avoir décrit la physiologie de la différenciation lymphocytaire B et des remaniements des gènes des immunoglobulines, nous montrerons les relations entre altérations des gènes des immunoglobulines et lymphomagénèse B. Puis nous donnerons les caractéristiques cliniques et biologiques cardinales des SMZL et des NMZL. Les LPL/WM seront discutés ici au même titre que les MZL. Nous exposerons ensuite nos objectifs de travail. Un chapitre sera consacré à la description précise de la méthode d'étude des gènes des immunoglobulines. Les articles de la thèse seront présentés et les résultats discutés à la lumière de la littérature.

*Chapitre 1 : Physiologie de la
différenciation lymphocytaire B et des
remaniements des gènes des
immunoglobulines*

Physiologie de la maturation des gènes des immunoglobulines de la réponse immune B

1. Généralités sur les immunoglobulines humaines

1.1. La protéine immunoglobuline

Très classiquement, l'immunité dite humorale est médiée par les immunoglobulines, appelées également anticorps. Chez l'homme, l'étude des myélomes a permis très tôt de montrer que chaque immunoglobuline est une protéine unique quant à ses caractéristiques physico-chimiques (2). Les immunoglobulines sont exprimées à la fois à la surface du lymphocyte B, formant alors le récepteur à l'antigène (BCR pour B-cell receptor) et sous forme sécrétée (l'anticorps). Elles répondent toutes à un même schéma d'organisation.

Les immunoglobulines sont des protéines de 150 kDa environ, comprenant deux chaînes lourdes IgH (Heavy) et deux chaînes légères IgL (Light) reliées entre elles par des ponts disulfures (3). Les chaînes d'immunoglobulines sont subdivisées en domaines de 105 à 110 acides aminés. Chacune des chaînes d'immunoglobuline (Ig) est composée d'une région constante, d'une région charnière et d'une région variable (figure 1).

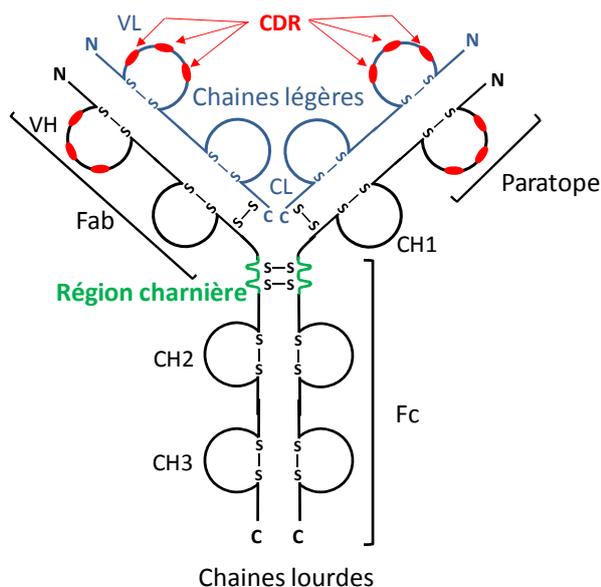


Figure 1 : représentation schématique d'une IgG1 humaine

l'immunoglobuline est constituée de 2 chaînes lourdes (noir) comportant 3 domaines constants (CH1 à CH3) pour l'IgG1 et un domaine variable (VH) à l'extrémité N terminale et de 2 chaînes légères (bleu) comportant un domaine constant (CL) à l'extrémité C-terminale et un domaine variable (VL) à l'extrémité N-terminale. Des ponts disulfures (S-S) relient les chaînes entre elles. Chaque domaine variable contient 3 CDR (Complementary Determining Region) (rouge) et un pont disulfure. Une région charnière (vert) sépare les domaines CH1 et CH2 de l'IgG1. Le paratope est formé des domaines variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère. Sont indiqués également les fragments obtenus par digestion à la papaïne : le fragment Fc (Fragment Cristallisable) contenant les propriétés effectrices de l'immunoglobuline et les 2 fragments Fab (Fragment antigen binding) contenant le domaine de liaison à l'antigène.

Source : (4), d'après Eastern Biotech (5) et Lefranc M.-P. IMGT Education IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®, Montpellier, France, 2002 (6).

La région constante comprend 3 à 4 domaines Ig pour les chaînes lourdes (domaines CH) et un domaine Ig pour la chaîne légère (CL). La région variable ne comprend qu'un seul domaine Ig pour la chaîne lourde et la chaîne légère (VH et VL respectivement) (4). Chaque domaine est une structure en forme de tonneau dans lequel la chaîne polypeptidique forme des brins qui courent en direction opposé et se replient pour former deux feuillets β unis par un pont disulfure (deux couches de feuillets beta, chaque couche étant composées de 3 à 4 chaînes polypeptidiques antiparallèles). Cette structure de repliement est appelée domaine d'immunoglobuline et est retrouvée au sein de très nombreuses protéines cellulaires.

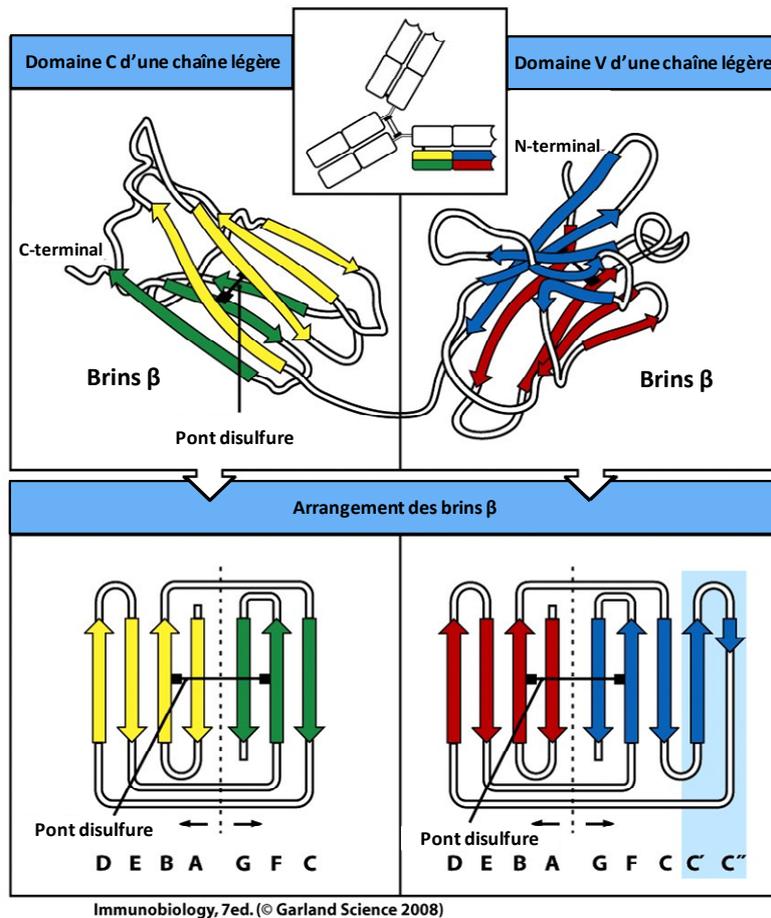


Figure 2 : Structure des domaines d'immunoglobulines constants et variables

Le panneau du haut montre schématiquement le mode de repliement des domaines constant et variable (V) d'une chaîne légère d'immunoglobuline. Chaque domaine est constitué de deux feuillets β unis par un pont disulfure (en jaune et vert pour le domaine constant et en bleu et rouge pour le domaine variable). Le panneau du bas représente les feuillets β dépliés. Les lettres alphabétiques correspondent aux segments polypeptidiques des feuillets β dans l'ordre d'apparition sur la séquence. Le domaine constant est constitué de 4 chaînes plus 3 chaînes. Le domaine variable contient deux chaînes supplémentaires (fond bleu).

Source : (3)

Il existe différentes chaînes lourdes qui déterminent 5 classes d'immunoglobulines ou isotypes (chaînes lourdes gamma, alpha, mu, delta et epsilon) ainsi que 9 sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD et IgE). La partie constante de ces différentes chaînes lourdes confère à l'Ig ses fonctions effectrices (fixation du complément, interaction avec des récepteurs spécifiques...). Il existe deux types de chaînes légères: kappa ou lambda, elles présentent toutes deux un seul domaine constant. La région dite constante des Ig est ainsi appelée parce que, au sein d'une même espèce, elle est identique entre toutes les immunoglobulines d'une même classe.

Les domaines variables des chaînes légères et des chaînes lourdes sont appelés ainsi car leur séquence en acides aminés diffère d'une molécule d'Ig à l'autre (d'un anticorps à l'autre). Les domaines variables constituent le site de reconnaissance à l'antigène. Les immunoglobulines sont ainsi des protéines duales capables de reconnaître l'antigène et d'avoir des fonctions effectrices particulières.

Le site de reconnaissance de l'antigène par l'immunoglobuline est aussi appelé l'épitope. La structure complémentaire au niveau de domaine variable de l'Ig est le paratope. Ce paratope est défini par des régions spécifiques du domaine variable des chaînes lourdes et légères : les CDR (Complementary Determining Regions). Ces CDR sont au nombre de trois dans chaque domaine variable de la chaîne lourde et de la chaîne légère, ils correspondent à des régions hypervariables. Ces 3 régions hypervariables sont encadrées par des 4 régions relativement peu variables, les FR (Framework Regions), qui constituent la charpente et donnent une configuration stable au domaine V (Figures 1 et 9).

1.2 Organisation des gènes des immunoglobulines chez l'homme

Les gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines sont situés sur un même locus du chromosome 14, localisé en 14q32 sur une distance supérieure à 1 mégabase. Le locus de la chaîne légère kappa est sur le chromosome 2 en 2p12 et celui de la chaîne légère lambda sur le chromosome 22 en 22q11. Ces gènes sont exprimés uniquement dans la lignée B. A l'état germinale, les gènes présents dans les différents loci ne sont pas fonctionnels. Ils doivent subir des réarrangements intra-géniques au cours de la différenciation B pour être fonctionnels.

1.2.1 Organisation des gènes de la chaîne kappa

A l'état germinale, le locus de la chaîne légère kappa s'étend sur 1,82 mégabases. Au plan fonctionnel, dans le sens 5' → 3', on distingue les segments ou gènes *IGKV* (variable K), les segments *IGKJ* (Junction K) et le segment de la partie constante, dit segment *IGKC*. Les gènes *IGKV* sont répartis en deux clusters séparés de 800kb : un cluster de 400Kb distal en 5' par rapport aux gènes *IGKJ* suivants et dans une orientation inverse contenant 36 gènes *IGKV* et un cluster proximal dans le même sens d'orientation, qui contient 40 gènes *IGKV* (7). Ces segments codent la majeure partie de la région variable soit 95 à 100 acides aminés. Il existe 5 gènes *IGKJ*. Ces gènes codent la partie terminale du domaine variable sur 10 à 15 acides aminés (8) (Figure 3).

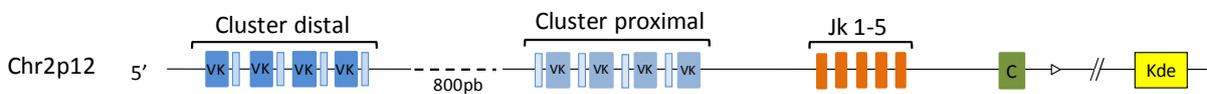


Figure 3 : représentation schématique du locus des chaînes kappa

Dans sa configuration germinale, le locus kappa, comprend une région variable constituée de deux clusters de gènes *IGKV* en orientation inverse. Chaque gène *IGKV* est précédé d'une séquence leader dans le sens codant (bleu pâle). Le locus contient ensuite 5 gènes *IGKJ* (orange) et un exon codant pour le domaine constant *IGKC* (vert). A l'extrémité 3', on trouve une séquence RSS (▷) ainsi que le K deleting element (Kde) (jaune).

Source : d'après <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=locus&species=human&group=IGK> 09/12/12 (8, 9)

Chaque segment *IGKV* est précédé d'une séquence leader comprenant deux exons séparés par un intron le tout précédé en 5' par un promoteur spécifique du lignage B, dit promoteur V (10). Chaque segment *IGKV* est aussi suivi d'un site dit RSS (recombination signal sequence, cf ci-après) (figures 4 et 5). Il existe aussi un signal RSS dans l'intron situé entre les *IGKJ* et *IGKC*. En 3' de *IGKC* se trouve aussi un élément supplémentaire, appelé Kde (Kappa deleting element), comportant un site RSS fonctionnel en 5' (Figure 3).



Figure 4 : représentation d'un gène IGKV :

Dans le sens 5' → 3', le gène est formé d'une région promotrice contenant une séquence nonamérique très conservée incluant un motif octamérique en amont de la TATA box précédé d'une séquence heptamérique assurant l'efficacité et la spécificité du promoteur. Puis on trouve les séquences leaders composées de deux exons séparés par un intron suivi de l'exon *IGKV* et d'une séquence RSS (un heptamère et un nonamère séparés par un séparateur de taille de 12 nucléotides)

Source : (10)

```

ctgaggaata tttaaaat tc tcaaaaaaat acctaaaaat tgtttctcat aataaaaatag      60
tcccagtag aaacacat tc tctgcagaca aat ttgtgct accctggctc ta cctgggac      120
acctggggac actgagctgg tgctgagtta ctgagatgag ccagctc tgc agctgtgccc      180
agcctgcccc atccctgct catttgcatg ttccagagc acaacctcct gc cctgaagc      240
cttattaata ggctggtcac actttgtgca ggagt cagac tcagtcagga ca cagc atgg      300
acatgagggt ccccgctcag ctctggggc tctctgctgct ctggctccca ggtaaggaag      360
gagaacacta ggaatttact cagcccagtg tgctcagtac tgccctgggta tt caggggaaag      420
tcttctata atatgatcaa tagtatgaat atttggttt ctatttccaa tctcaatgctc      480
caaatgtgac atccagatga ccagctctc ttcaccctcg tctgcatctg taggagacag      540
agtcaccatc acttgccggg ccagtcagag tat tagtagc tgggtggcct ggatcagca      600
gaaaccaggg aaagcccta agctcctgat ctagatgcc tccagtttg aaagtgggg      660
cccatcaagg ttcagcggca gtggatctgg gacagaattc actctacca tcagcagcct      720
gcagcctgat gat ttgcaa ctattactg ccaacagtat aatagt tatt ctccacagct      780
gttacacacc cgaacataaa ccaccagga agcagatgtg tgaggcaggg ctgcccagc      840
tgctctcct gatgcctcta tcagctgaga gtggctccta gatgcagcca cactctgatg      900
gtgttgtag agggggacat ggagtcacct ctgcaacctc attctttct ctctctcagc      960
cccaactgca cagatctagc aatgccctct ctgat ttaat aaagacagag atcatgacac      1020
ctgaagagtc tagtttatgg cttcagctgg actttatata acagagaaga ggccatata      1080
gatattcaaa gcaggaat tg tcttaataca gacaattaga gtctaaacta ctggaagcta      1140
aataaaatgt agagatgaat ctctaaattt aatgttttac g      1181
    
```

Figure 5 : exemple de la séquence IGKV1-5

Les couleurs surlignant le texte figurent les différents éléments représentés sur le schéma correspondant ci-dessus.

Source : (10), référence de séquence Z0001 selon IMGT®

1.2.2 Organisation des gènes de la chaîne lambda

Dans le sens 5' → 3', les segments lambda comprennent les gènes *IGLV*, avec 73 à 74 gènes *IGLV*, regroupés en 11 familles sur 900kb dont 29 à 33 sont fonctionnels. Ces segments *IGLV* sont organisés de la même façon que les segments *IGKV*. Puis on trouve les gènes *IGLJ* et *IGLC*, regroupés en tandem JL-CL. Il existe 7 à 11 tandems dont 4 à 5 sont fonctionnels (11).

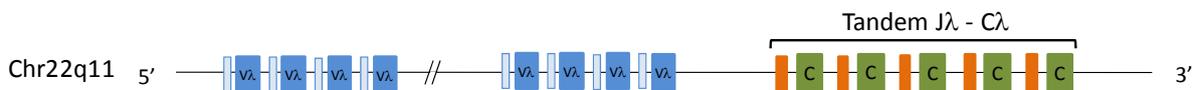


Figure 6 : représentation schématique du locus IG lambda

Le locus comporte les segments géniques *IGLV* (bleu) précédés chacun d'une séquence leader puis les couples de segments *IGLJ* (orange) - *IGLC* (vert) dont 4 à 5 sont fonctionnels.

Source : d'après <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=locus&species=human&group=IGL> 09/12/12

1.2.3 Organisation des gènes de la chaîne lourde

L'organisation des gènes de la chaîne lourde est plus complexe car inclus des segments *IGHD* (Diversity) entre les segments *IGHV* et *IGHJ*, et plusieurs segments constants pour les différents isotypes de chaînes lourdes.

Dans le sens 5' → 3', on trouve 123 à 129 gènes *IGHV* selon les haplotypes, dont une majorité est non fonctionnelle (38 à 46 gènes *IGHV* fonctionnels), suivi de 27 gènes *IGHD* (dont 23 fonctionnels) et de 9 gènes J (dont 6 fonctionnels). Comme pour les chaînes légères, les gènes *IGHV* sont précédés d'une séquence leader et suivis d'une séquence RSS, et les gènes *IGHJ* précédés d'une séquence RSS en sens inverse. Les gènes *IGHD* sont quant à eux flanqués d'une séquence RSS en 5' et une en 3' (12).

Entre les gènes *IGHJ* et les gènes *IGHC*, se trouve le locus $E\mu$ flanqué de ses séquences MAR (Matrix Attachment Region) impliqué dans la régulation de l'expression des chaînes lourdes des Ig. Les gènes *IGHC* comprennent 9 gènes fonctionnels et 2 gènes non fonctionnels, avec, dans l'ordre 5' → 3' M, D, G3, G1, EP1, A1, GP, G2, G4 E1, A2. Le locus des chaînes lourdes comprend en 3' la LCR 3' IGH (locus control region), répartie en deux régions en aval de chaque *IGHCA* (3'α1RR et 3'α2RR). Ces éléments sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes d'Ig et dans la régulation de la commutation de classe. Excepté pour le segment δ, chaque segment constant est flanqué en 5' de régions switch. Ces régions sont constituées de motifs répétés riches en G et C, leur taille variant de 1 à 10 kb.

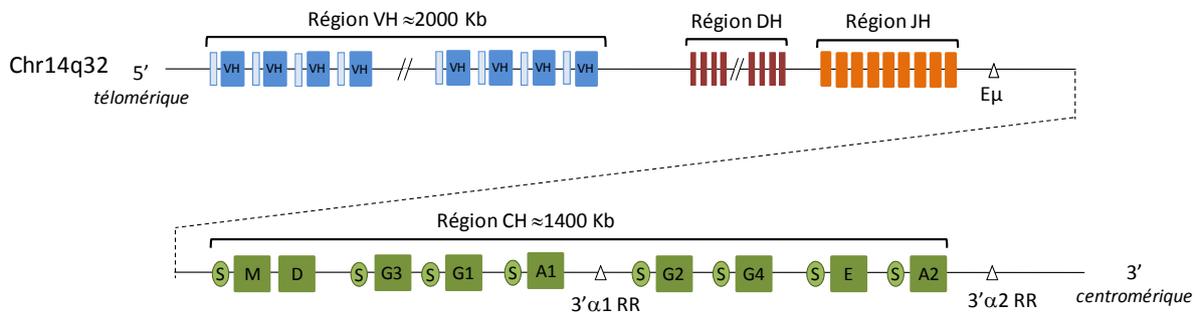


Figure 7 : représentation schématique du locus des chaînes lourdes d'immunoglobuline.

Le locus de la chaîne lourde comprend en 5' les segments géniques *IGHV* suivis des gènes *IGHD* et *IGHJ*. Puis on trouve l'enhanceur $E\mu$ (▶) et la région des gènes *IGHC* avec les éléments régulateurs en 3' (▶). Les gènes non fonctionnels de la région CH ne sont pas représentés ici.

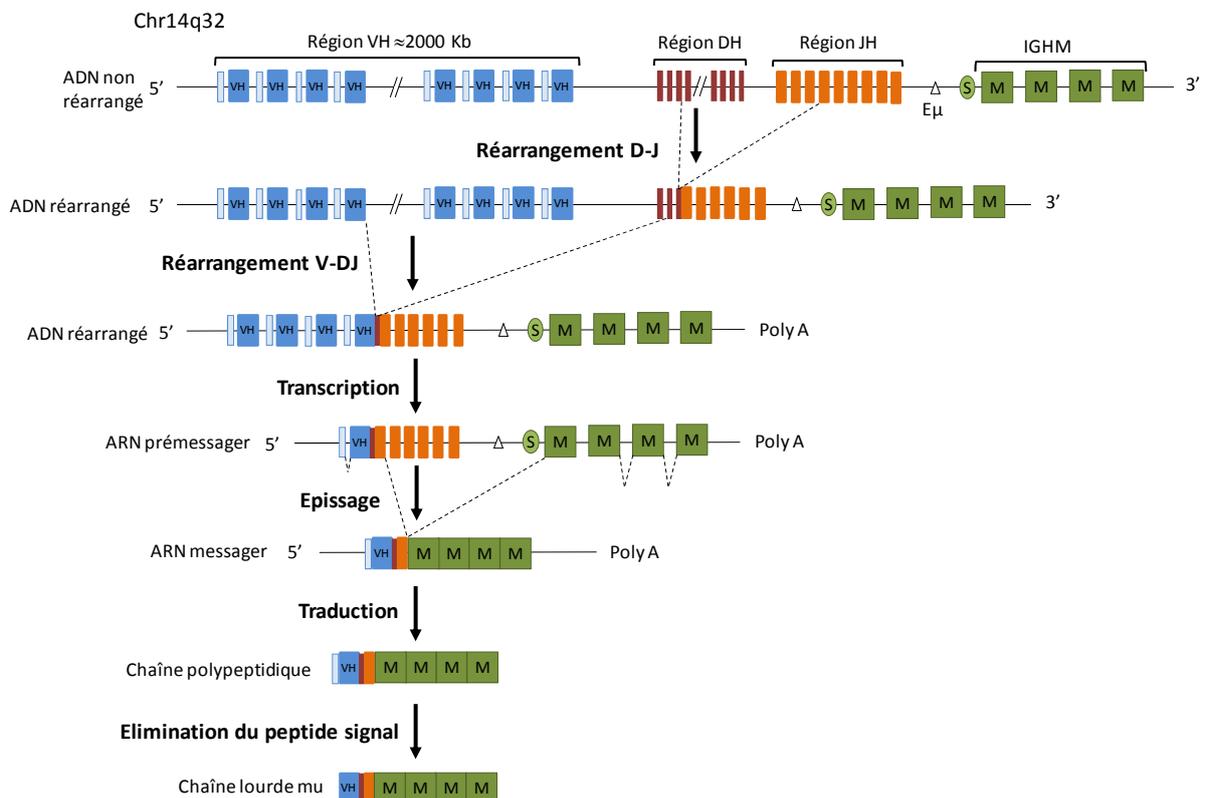
Source : d'après <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=locus&species=human&group=IGH> 09/12/12, (12)

2. Réarrangement des gènes des immunoglobulines dans la moelle osseuse

2.1. Le réarrangement VJ et VDJ et la diversité des immunoglobulines (d'après (13))

La formation d'un gène fonctionnel résulte d'une recombinaison entre un gène V et J pour les chaînes légères et de deux recombinaisons entre un gène D et J puis entre un gène V et le segment DJ réarrangé pour la chaîne lourde (3). Lors de la lymphopoïèse B, le réarrangement de la chaîne lourde se produit avant celui des chaînes légères, et le locus kappa est réarrangé avant le locus lambda. La séquence réarrangée est ensuite transcrite jusqu'au gène IGHCM pour la chaîne lourde et jusqu'au domaine constant pour les chaînes légères. L'ARN nouvellement formé, un ARN pré-messager, est ensuite épissé au niveau des gènes J en 3' du réarrangement et des introns du gène IGHM pour former un ARN messager mature. Ce dernier présente des régions 5' et 3' non traduites (UTR) de part et d'autre du segment codant V(D)JC. La traduction de ce brin d'ARN donne une chaîne polypeptidique, puis l'élimination du peptide leader aboutit à une chaîne lourde Mu ou à une chaîne légère (figure 8).

A



B

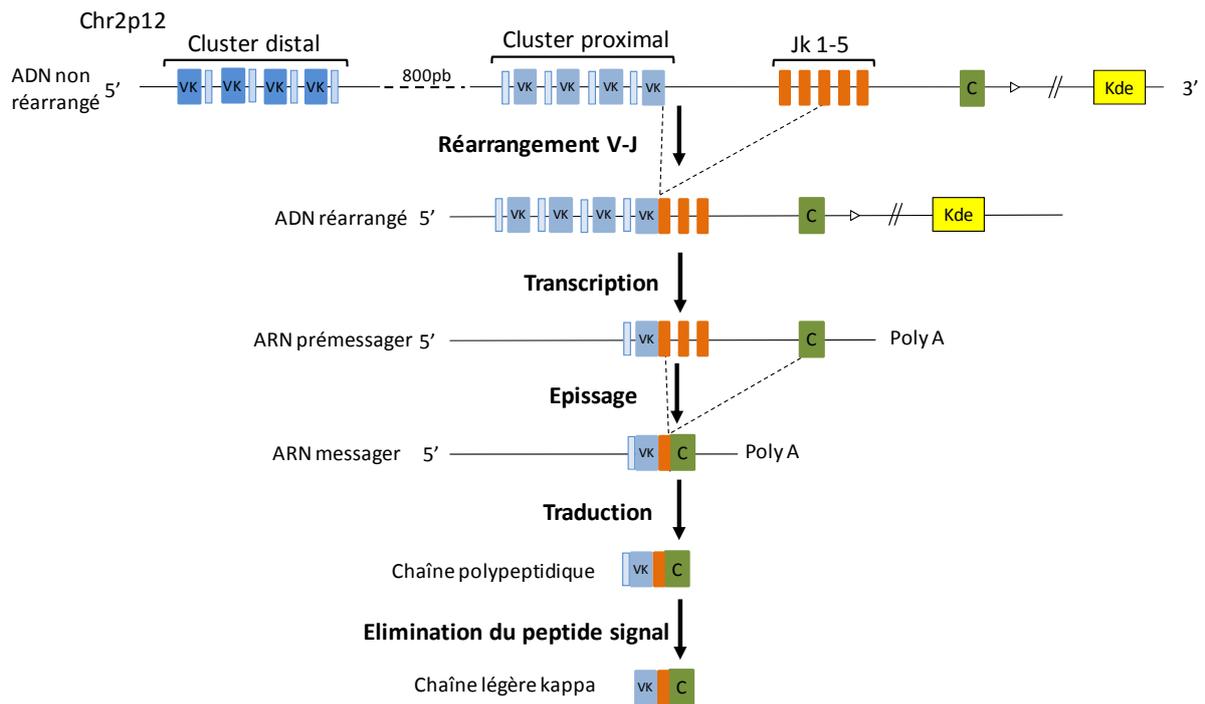


Figure 8 : Réarrangement VDJ du locus des chaînes lourdes et VJ des chaînes légères

A : Sur le locus de la chaîne lourde, la première recombinaison se produit entre un segment D et un segment J puis un deuxième réarrangement réunit un segment V au segment DJ pour former un exon complet VH. La séquence réarrangée IGHV-D-J est transcrite avec les segments constants en un ARN pré-messager. Ce transcrit est épissé afin de former un ARN messager comprenant une région 5' non traduite, la région codant le domaine variable puis constant, une région 3' non traduite et la queue de polyadénylation. Le transcrit est ensuite traduit en une pré-protéine qui aboutit à la chaîne lourde mu définitive par clivage du peptide signal.

B : Sur le locus de la chaîne légère kappa, le réarrangement des chaînes légères suit le même processus. Il est simplifié car un seul réarrangement se produit entre un segment V et un segment J. Ici il s'agit de l'exemple du réarrangement de la chaîne kappa.

Source : IMGT® (6)

Lorsque les gènes des immunoglobulines sont réarrangés, les segments FR1 à FR2 des immunoglobulines sont codés par le segment V. Le CDR3 correspond à la jonction VDJ pour la chaîne lourde et la jonction VJ pour les chaînes légères. FR4 correspond à la partie terminale du segment JH (Figure 9).

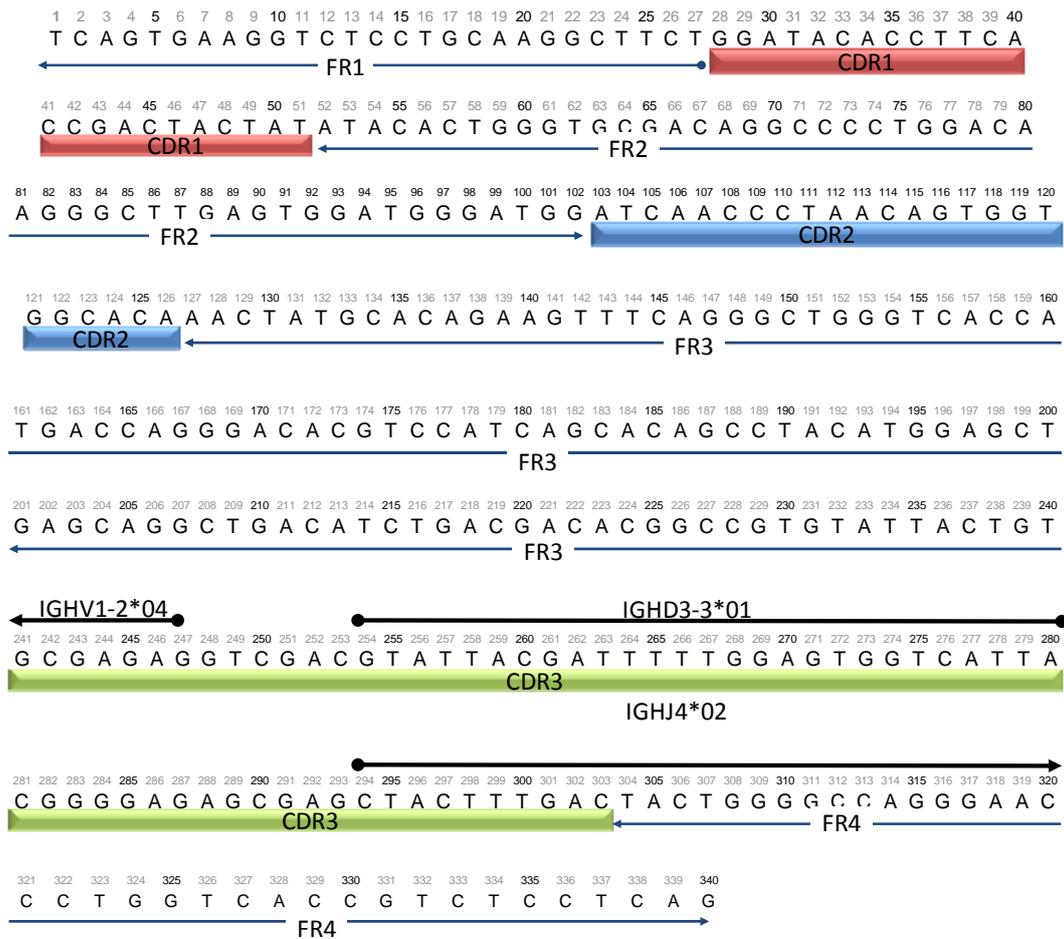


Figure 9 : séquence VDJ de l'IGH tumorale d'un SMZL de notre série publiée

Elle illustre la relation entre séquence nucléotidique, segments géniques VDJ réarrangés et segments FR1 à FR4 et CDR1 à CDR3 de la chaîne lourde d'Ig correspondante. Les flèches délimitent les FR le long de la séquence IGHV1-2, les boîtes en couleur délimitent les CDR. Les traits plein noirs indiquent les segments V, D et J. Source : (14)

Comme évoqué ci-dessus, la recombinaison fait intervenir les séquences RSS (15). Dans le détail, les RSS sont constitués de deux motifs très conservés, les heptamères et nonamères, séparés par une séquence peu conservée de 12 ou 23 nucléotides (3). La recombinaison ne peut s'effectuer efficacement qu'entre des RSS comportant des séparateurs de taille différente, un intervalle de 12 nucléotides pour l'un et un intervalle de 23 nucléotides pour l'autre (règle dite 12/23). Pour les chaînes lourdes, les séquences RSS en 3' des segments V et en 5' des segments J ont des séparateurs de 23 nucléotides, et les séquences RSS flanquant les segments D ont un séparateur de 12 nucléotides, ce qui impose une contrainte directionnelle au réarrangement (figure 10).

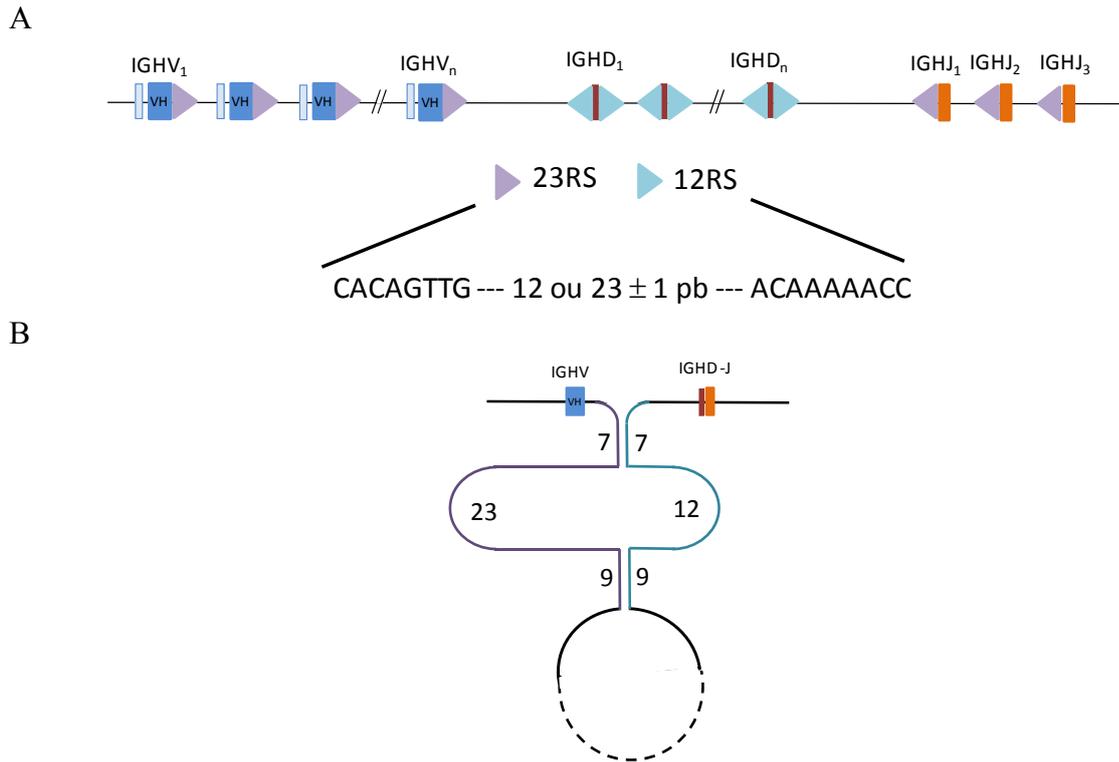


Figure 10 : Mécanisme du réarrangement à partir des motifs heptamériques et nonamériques

A : représentation des séquences RSS en fonction des motifs conservés de 7 (heptamères) ou 9 nucléotides (nonamères) flquant les segments géniques et de leurs séquences intercalaires de 12 ou de 23 nucléotides sur le locus des chaînes lourdes

B : exemple de recombinaison entre un gène V et un gène J du locus lambda.

Source : d'après <http://www.easternbiotech.com/Immune-System.php> 09/12/12

Le phénomène de recombinaison VDJ est précédé par la transcription des gènes qui vont être réarrangés. Ces transcrits sont dits stériles car ne sont pas traduits en protéines. Ils sont interprétés comme le témoin de la décondensation chromatinienne afin de permettre l'accès du complexe de recombinaison aux sites RSS (16, 17). Ces transcrits peuvent s'associer de façon stable au brin d'ADN matrice pour former des hybrides dans lesquels le brin non matrice peut adopter une structure en boucle, la boucle R. Les réarrangements VDJ se produisent sous l'action des recombinases RAG1 et RAG2 (Recombination Activation Gene) (18, 19). Ce sont les seules enzymes absolument nécessaires à la recombinaison des gènes des Ig. Elles sont exprimées exclusivement dans le lignage lymphocytaire, au stade de précurseur médullaire pour le lignage lymphocytaire B (cf ci-après). La première étape consiste en l'appariement des séquences heptamère nonamère selon la règle 12/23, aboutissant à la formation d'une boucle (20). Ces boucles se forment et se déforment lorsque le locus va réarranger. Ce phénomène est appelé contraction/décontraction monoallélique du

locus. Une haute fréquence de contraction/décontraction augmente la probabilité d'accès du complexe de recombinaison aux séquences RSS appariées. La coupure enzymatique de l'ADN par RAG1 et RAG2 se fait à l'extrémité 5' de l'heptamère (21). La cassure introduit un groupement hydroxyle en 3' et libère une extrémité 5' phosphate sur l'autre brin cassé au même endroit. Les deux extrémités 5'P et 3'OH sont alors ligaturées pour former une boucle. La restauration de la continuité du segment codant V-J, D-J ou V-DJ implique un mécanisme de réparation faisant intervenir la voie dite du Non Homologous End Joining (NHEJ). Les protéines Ku 70 et 80 interagissent au niveau des boucles permettant ainsi le recrutement de la protéine Kinase dépendante du DNA, la DNA-PK qui met bout à bout les extrémités à ligaturer. Les boucles sont alors ouvertes par une endonucléase activée par phosphorylation de la DNA-PK. La ligature est effectuée par un complexe comprenant la DNA ligase IV et le XRCC4 de manière à former un joint codant réunissant les exons et un joint circulaire contenant les séquences RSS (figure 11 ci-après) (3).

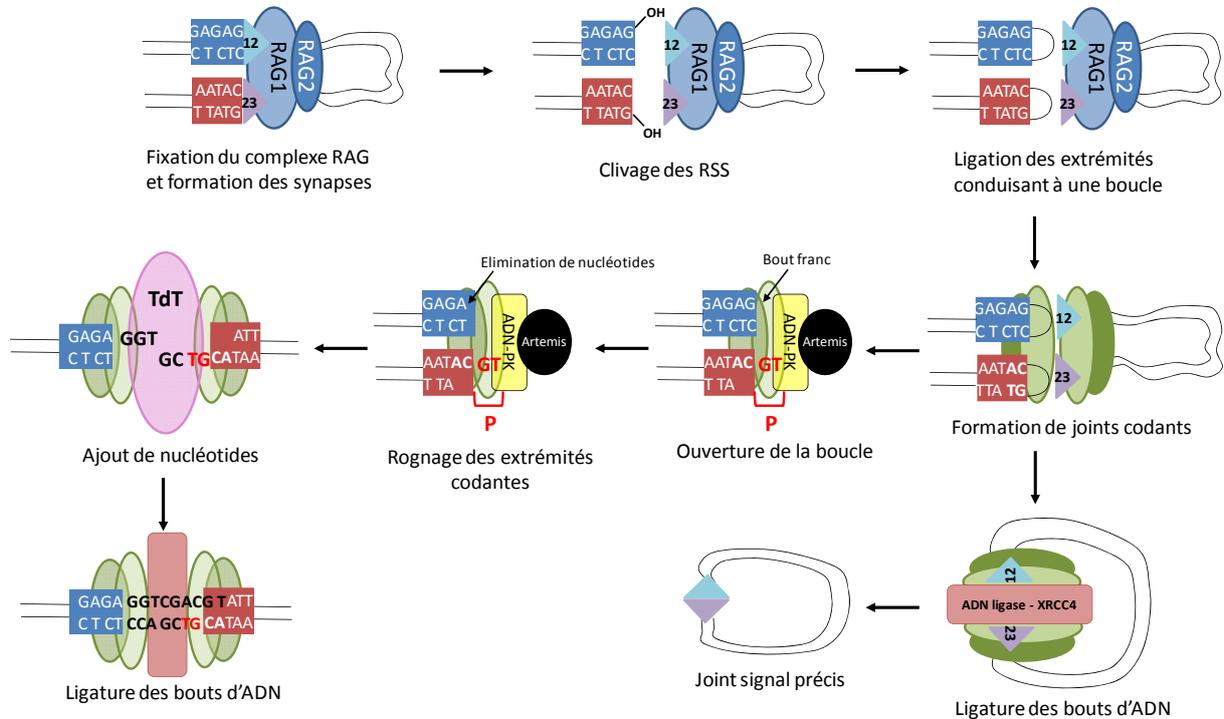
Deux sources de diversité des immunoglobulines sont décrites, la diversité combinatoire et la diversité jonctionnelle. La diversité combinatoire résulte de la combinaison des gènes V, D et J pour la chaîne lourde et V et J pour les chaînes légères. La diversité jonctionnelle est en rapport avec l'imprécision du mécanisme de recombinaison au niveau du CDR3. Le complexe RAG1/RAG2 provoque une cassure en 5' de l'heptamère dont la position est un peu aléatoire sur une dizaine de paires de base (22). Après formation puis ouverture de la boucle, les extrémités peuvent être (3, 4) :

- ✓ rognées par des exonucléases ce qui entraîne des délétions aléatoires,
- ✓ allongées par la terminal déoxynucléotide transférase (TdT) qui ajoute de façon aléatoire des nucléotides (23). Les nucléotides ajoutés ne sont alors pas complémentaires aux segments codants. C'est la N-diversité (pour N nucléotides),
- ✓ sujette à l'action directe de complexe de recombinaison. Lorsque les extrémités ne sont pas franches mais dissymétriques, l'addition de 1 à 2 nucléotides par la polymérase est complémentaire à la matrice et crée ainsi une petite séquence palindromique de 2 à 4 nucléotides. C'est la P diversité (P pour palindromes) (figure 11).

Au total, on estime que ces mécanismes de diversité permettent de produire plus de 6300 chaînes lourdes différentes et 355 chaînes légères différentes. A cela s'ajoute la N diversité au niveau jonctionnelle, contribuant à augmenter le nombre de possibilités d'un

facteur mille à 10 000 tant pour la chaîne lourde que pour la chaîne légère ce qui, en combinatoire, correspond à plus de $2 \cdot 10^{12}$ immunoglobulines possibles (24).

A



B

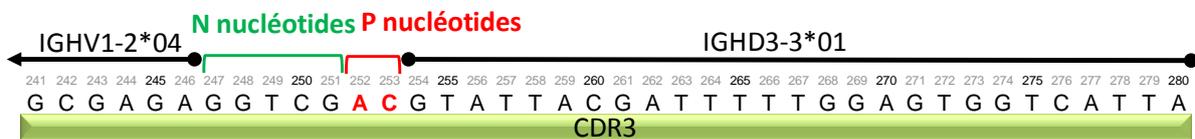


Figure 11 : le mécanisme de recombinaison

A Détail du mécanisme de la recombinaison entre un gène IGHV et un gène IGHD

Le complexe RAG (bleu) se lie à une des séquences RSS pour former des synapses sur chaque brin et couper l'ADN entre l'heptamère et la région codante. Le groupe 3'OH libéré réagit avec la liaison phosphodiester sur le brin opposé permettant ainsi la formation d'une boucle. Les protéines Ku (en vert) se lient aux extrémités d'ADN permettant le recrutement de l'ADN-PK - Artemis du côté des segments codants. Ce dernier complexe ouvre la boucle. On obtient une extrémité à bouts francs ou des P nucléotides. Les enzymes de réparation du complexe éliminent des nucléotides de manière aléatoire. La désoxynucléotidyl transférase (TdT) ajoute des nucléotides N. Enfin le complexe XRCC4, Cernunnos (non représenté) et DNA ligase IV assure la ligation. Aux extrémités des séquences signal (triangles turquoise et mauve), le même complexe de réparation assure la ligation des brins de manière précise pour former le joint signal. Les extrémités sont celles des segments codants utilisés dans la séquence de la figure 9

B détail de la séquence de la figure 9 obtenue après réarrangement VDJ de la chaîne lourde

Sources : (3, 4). L'analyse jonctionnelle de la séquence prise en exemple a été analysée dans IMGT-VQUEST® (25)

2.2 Différenciation lymphocytaire B intra médullaire chez l'humain

Plusieurs nomenclatures sont utilisées dans la littérature pour nommer les progéniteurs et précurseurs lymphoïdes B. Nous pouvons par exemple citer la nomenclature de l'EGIL (European Group for Immunophenotyping Leukemia) (26), ou celle en rapport avec la description des hématogones (terminologie hématologiste pour désigner les cellules B immatures médullaires (27)). Ici, nous avons choisi arbitrairement d'adopter une terminologie que nous appellerons « immunologique » distinguant 4 grands stades, le progéniteur lymphoïde commun, la cellule proB, la cellule préB, et la cellule B immature. Cette terminologie nous semble être celle adoptée par la majorité des auteurs anglo-saxons pour la littérature tant immunologique qu'hématologique. En effet, c'est pour ces 4 stades qu'est le mieux décrite la corrélation entre différenciation lymphocytaire B phénotypique et recombinaison des régions variables des gènes des immunoglobulines.

Comme toutes les cellules sanguines circulantes, les cellules B dérivent d'une cellule souche pluripotente hématopoïétique. Cette cellule souche est nichée contre les travées osseuses des os plats, au contact des cellules stromale. La différenciation est centripète, vers les sinusoides médullaires. La cellule souche hématopoïétique exprime le récepteur FLT3 et le facteur de transcription PU.1 (impliqué dans la physiopathologies des leucémies aiguës myéloblastiques, (28)).

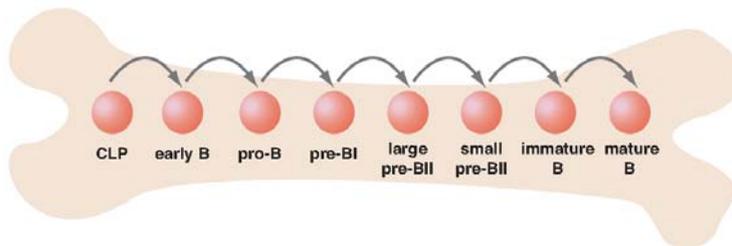
Le signal tyrosine kinase délivré par FLT3 (oncogène, récepteur à tyrosine kinase appartenant à la sous-classe III et dont les altérations géniques sont un facteur de mauvais pronostic dans les leucémies aiguës myéloïdes (29)) permet à la cellule souche hématopoïétique de se différencier en progéniteurs myéloïde et lymphoïde commun. Ce dernier, a pour marqueurs membranaires les molécules CD45 (exprimé faiblement), CD43 et CD117 (c-Kit, récepteur du stem cell factor ou SCF). Le progéniteur lymphoïde commun exprime aussi le facteur de transcription Ikaros et le récepteur à l'IL7 (30).

En présence d'IL7, sécrétée par les cellules stromales, le progéniteur lymphoïde commun se différencie en cellule proB exprimant le facteur de transcription Pax5, marqueur du lignage B jusqu'au stade plasmocytaire, ainsi que la molécule CD19 dont le gène est la cible de Pax5. La cellule proB exprime aussi les marqueurs de surface CD10, CD34, CD38 et HLADR, ainsi que la chaîne alpha du BCR (CD79a) en intracytoplasmique, la TdT et les enzymes RAG1 et RAG2 en intranucléaire (31). A ce stade se produit le réarrangement VDJ

de la chaîne lourde. Récemment, deux sous-populations de progéniteurs lymphocytaires B ont été décrites chez l'homme, celle exprimant le récepteur à l'IL7 (CD127) et celle ne l'exprimant pas. Les études fonctionnelles réalisées en modèle de xélogreffe de cellules humaines ont permis de montrer que la principale fonction de cette cytokine est de bloquer le réarrangement prématuré de la chaîne légère (32).

Le stade suivant, dit préB, est caractérisé par l'expression du préBCR (association de la chaîne lourde réarrangée avec les molécules VpréB et lambda 5 (33, 34) (cf ci-après, chapitre exclusion allélique). Les autres molécules exprimées par la cellule préB sont CD19 (reflétant l'activité de Pax5), CD10 et CD20. La chaîne lourde μ est retrouvée exprimée en intracytoplasmique.

Le réarrangement de la chaîne légère se fait au stade B dit immature. A ce stade, la cellule perd l'expression de CD34 mais conserve l'expression du CD10. Lorsque le réarrangement de la chaîne légère est réussi, l'expression des enzymes RAG est arrêtée et la cellule B exprime une IgM et une IgD de surface, devenant ainsi une cellule B dite mature ou périphérique au sens « post-médullaire » (la discussion entre cellule B mature et cellule B transitionnelle sera faite au chapitre « différenciation lymphocytaire B périphérique »).



CD34	+	+	+	-	-	-	-	-
CD10	+	+	+	+	+	+	+	-
IL-7R α	+	+	+	-	-	-	-	-
CD19	-	-	+	+	+	+	+	+
CD79a	-	+	+	+	+	+	+	+
TdT	-	-	+	-	-	-	-	-
RAG	-	-	+	+	-	+	+	-
Vpre-B	-	+	+	+	+	-	-	-
μ H	-	-	+/-	+	+	+	+	+
pre-BCR	-	-	-	-	+	-	-	-
IgH	GL	DJ _H	V _H DJ _H					
κ L	GL	GL	GL	GL	GL	V _L J _L	V _L J _L	V _L J _L
cycling	-	-	-	+	+	-	-	-
Pax-5	-	-	+	+	+	+	+	+
sIgM	-	-	-	-	-	-	+	+
sIgD	-	-	-	-	-	-	-	+

Figure 12 : les différents stades de développement du lymphocyte B.

Source : (35)

2.3 Exclusion allélique

L'imprécision du mécanisme de réarrangement VDJ constitue un avantage en termes de diversité des séquences CDR3 des immunoglobulines. La contrepartie de cette imprécision est que ces réarrangements sont très souvent non fonctionnels (décalage du cadre de lecture, altération de la stabilité de la protéine, mauvais repliement ...).

Comme indiqué ci-dessus, le réarrangement VDJ de la chaîne lourde se produit avant le réarrangement VJ des chaînes légères. Alors que le réarrangement DJ se produit sur les deux allèles, le réarrangement de V peut être monoallélique selon qu'il soit fonctionnel ou non. La localisation du locus d'Ig peut être différente selon l'allèle, influençant le choix du 1^{er} chromosome réarrangé: brièvement, la localisation des gènes VDJ près de la lamina de la membrane nucléaire et/ou dans l'hétérochromatine peut avoir un impact négatif sur l'appariement des séquences RSS (formation des boucles) en limitant l'accessibilité des enzymes RAG. Une autre possibilité que l'allèle V réarrangé en premier soit celui du chromosome répliqué en premier lors de la phase S. Ainsi, le réarrangement des gènes V de la chaîne lourde apparaît asynchrone (36).

La conformation d'une chaîne lourde réarrangée est « vérifiée » par association avec les molécules V_{préB} et lambda 5. Ceci constitue le pré-BCR qui délivre un signal de survie au précurseur B (37, 38).

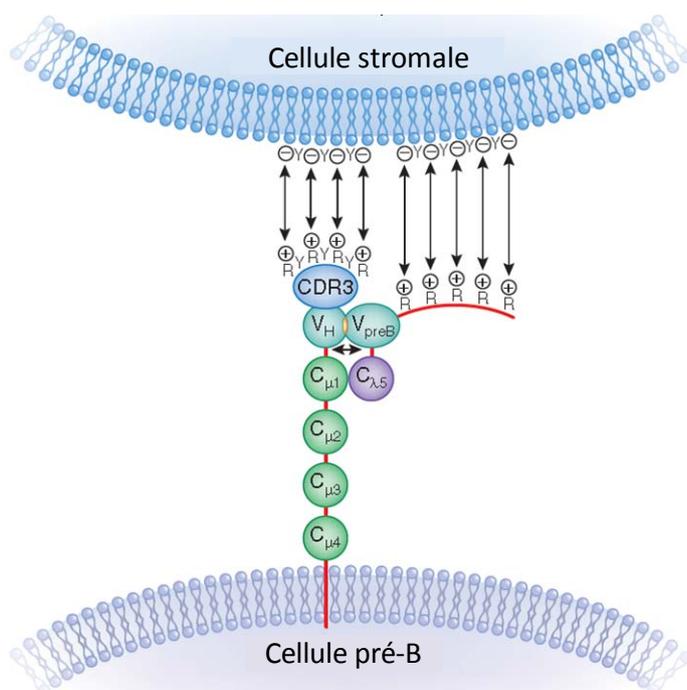


Figure 13 : le pré-BCR

Lorsque la cellule B a exprimé une chaîne lourde mu, cette dernière peut former le pré-BCR avec un substitut de chaîne légère. Dans le pré-BCR, le domaine VH de la chaîne lourde est associé à deux peptides invariants, C_{λ5}, homologue au C_λ et V_{pré-B}. Le C_{λ5} contient un motif riche en Arginine (ligne rouge) pouvant interagir avec les charges opposées d'une cellule stromale par exemple. Le domaine HCDR3 peut contenir également des résidus arginine. Ces interactions sont capables d'induire le signaling du BCR pour tester sa fonctionnalité et délivrer un signal de survie indispensable à la poursuite du réarrangement sur le locus de la chaîne légère

Source : (37)

Si le réarrangement VDJ du premier allèle est productif, cela entraîne l'arrêt des recombinaisons VDJ sur l'autre allèle. Ce phénomène serait du en partie à la contrainte conformationnelle chromatinienne limitant l'accessibilité des séquences RRS aux protéines RAG, réduisant fortement la probabilité d'avoir un réarrangement sur l'autre allèle (39).

Lorsque le réarrangement productif VDJ est sur le 2^{ème} allèle, les deux allèles sont transcrits à des taux à peu près équivalents. Cependant, l'ARN de l'allèle réarrangé non productif est instable car soumis aux mécanismes de surveillance des ARN, que ce soit par accumulation d'ARN prémessager non traduits (NMUP, nonsense-mediated upregulation of pre-mRNA), par épissage alternatif (NAS, nonsense-associated altered splicing) ou par dégradation des ARN messagers (NMD, nonsense-mediated mRNA decay) (40).

Si les réarrangements VDJ des deux allèles sont non fonctionnels, la cellule ne peut recevoir le signal de survie délivré par le pré-BCR et meurt par apoptose. Puis, lorsque le réarrangement des gènes de la chaîne kappa du premier allèle est fonctionnel, il y a production d'une immunoglobuline complète de type IgM. L'expression des enzymes RAG est stoppée et la mécanique de recombinaison est arrêtée. Si ce 1^{er} réarrangement VJ kappa n'est pas fonctionnel, le 2^{ème} allèle kappa est « essayé », puis les gènes lambda des deux allèles successivement. L'échec de production d'une chaîne légère kappa ou lambda fonctionnelle aboutit à la mort de la cellule par apoptose (41).

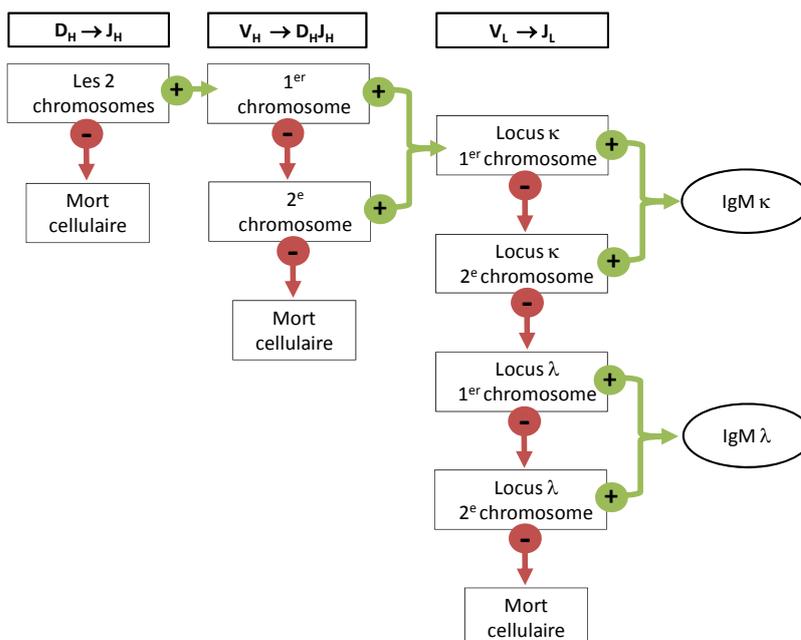


Figure 14 : dynamique des réarrangements des gènes des immunoglobulines et exclusion allélique.

Légende de la figure 14 : le réarrangement du locus de la chaîne lourde se produit au stade de la cellule proB. Ce réarrangement s'opère en deux temps. L'assemblage D_H-J_H s'effectue d'abord sur les deux allèles suivi d'un réarrangement V_H à D_HJ_H sur un seul des deux chromosomes. Si le réarrangement est productif, une chaîne mu est exprimée et le locus sur l'autre chromosome reste en configuration germinale. Le réarrangement du locus de chaîne légère ne s'opère que si les réarrangements des chaînes lourdes ont abouti à la formation d'un pré-BCR qui délivre alors un signal positif de survie. Le plus souvent, il commence par le locus kappa. S'il est improductif, il s'effectue sur le locus de l'autre chromosome, puis sur un locus lambda, etc... La chaîne légère dispose de 4 tentatives pour produire un réarrangement fonctionnel. Source : (42)

2.4 Correction du BCR (Editing ou réarrangements secondaires)

La production aléatoire d'un très grand nombre d'immunoglobulines différentes par leurs régions variables a pour conséquence la genèse de cellules B autoréactives. Quatre mécanismes de neutralisation des lymphocytes B autoréactifs sont décrits :

- 1) la délétion du clone autoréactif par mort cellulaire programmée (43)
- 2) L'anergie clonale, terme décrivant un état permanent du lymphocyte B tel qu'incapable de s'activer en présence de l'antigène spécifique de son BCR.
- 3) L'ignorance immunologique, décrivant l'incapacité du lymphocyte B à répondre à l'antigène spécifique de son BCR soit parce que cet antigène n'agrège pas le BCR soit parce qu'il en trop faible concentration soit parce qu'il est séquestré dans un compartiment inaccessible au BCR (exemple des antigènes intracellulaires) (44).
- 4) La correction du récepteur (receptor editing) (45). Ce dernier phénomène correspond à la genèse de nouveaux réarrangements des segments VDJ et/ou VJ de gènes des immunoglobulines déjà réarrangés, modifiant en profondeur la spécificité antigénique de l'immunoglobuline résultante.

En permettant à la cellule B autoréactive de modifier la réactivité de son BCR, la correction du BCR augmente la probabilité de réussite du processus complet de maturation de l'immunoglobuline tout en diminuant, en principe, le pourcentage de cellules B autoréactives.

Néanmoins, il est également possible que ce processus de correction contribue à l'auto-immunité. D'une façon générale, l'auto-immunité est portée principalement par la chaîne lourde des immunoglobulines et le CDR3 est le paratope le plus souvent impliqué. Notamment, il a été montré que des CDR3 de grande taille sont associés à la polyréactivité et à l'auto-immunité.

Au plan mécanistique, la correction de la chaîne lourde peut se faire selon plusieurs mécanismes.

- il peut s'agir d'un réarrangement dit « saute mouton » (leapfrogging). Un DH en amont du DH déjà réarrangé sur-réarrange avec un JH en aval du JH réarrangé, remplaçant le premier joint DJ. Chez l'homme, les réarrangements de la plupart des DH-JH6 (segment distal) semblent être contre-sélectionnés durant la différenciation B intramédullaire. Comme le JH6 est beaucoup plus long que les autres JH, il contribue très vraisemblablement à la grande taille du CDR3 associé à la polyréactivité.
- un autre mécanisme possible est la violation de la règle 12/13. Ainsi, soit un segment V peut directement réarranger avec un segment DJ, aboutissant à la délétion du locus D, soit des segments D peuvent réarranger entre eux. Approximativement 10 à 20% des séquences d'Ig humaines (46) ont un CDR3 long, certains contenant des segments DH-DH, ce qui augmente mécaniquement la taille des CDR3.
- Enfin, il peut s'agir d'un réarrangement d'un V proximal dans le V déjà réarrangé sur DJ, lequel V réarrangé comporte un site RSS cryptique. Ce réarrangement aboutit au remplacement de la partie 5' du V, mais préserve l'extrémité 3' réarrangée précédemment.

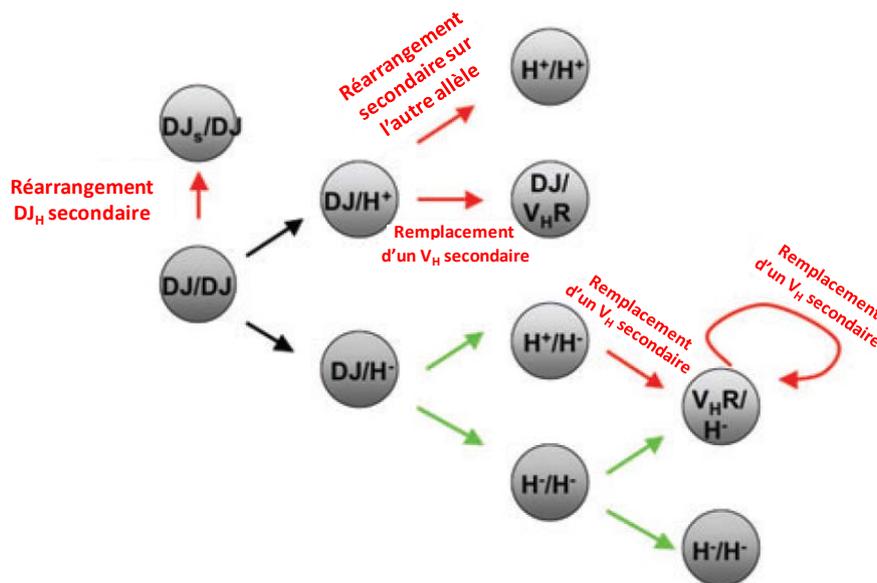


Figure 15 : réarrangement de la chaîne lourde chez l'homme et la souris

Au stade pro-B, la cellule subit le réarrangement D_H-J_H sur les deux allèles puis le réarrangement $V_H-D_HJ_H$ sur un allèle. Enfin surviennent les réarrangements secondaires incluant les réarrangements D_H-D_H non montrés ici. H+: réarrangement VDJ productif, H-: réarrangement VDJ non productif, $V_H R$: remplacement du segment V_H . Flèches noires : réarrangements primaires, les flèches vertes : les réarrangements secondaires dans la cellule B qui possède un ou plusieurs réarrangements non productifs, les flèches rouges les corrections du réarrangement dans la cellule ayant un ou plusieurs réarrangements productifs

Source : figure extraite de la publication de Luning Prak et coll., (45)

Les corrections des chaînes légères peuvent résulter également des 3 mécanismes cités pour la chaîne lourde. Cependant, et plus simplement, il s'agit avant tout d'un réarrangement « saute-mouton » entre un V proximal et un J distal. De plus, du fait de la disposition des deux clusters en sens inverse (voir figure 16), la recombinaison secondaire peut également se faire par inversion. Si le récepteur reste autoréactif, les réarrangements secondaires de la chaîne légère continuent jusqu'à ce qu'un récepteur non autoréactif soit produit ou que les segments V et J soient épuisés (la cellule meurt alors par apoptose) (figure 16).

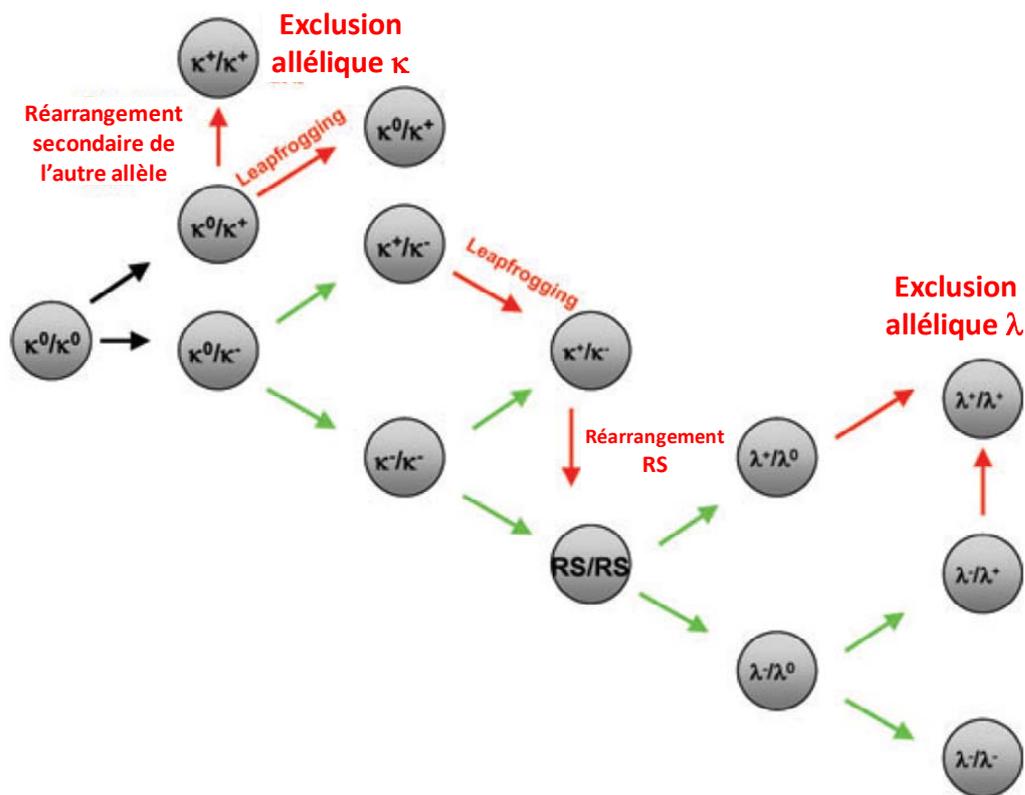


Figure 16 : réarrangements de la chaîne légère chez la souris :

Initialement la cellule est en configuration germinale (κ^0/κ^0 et λ^0/λ^0). Le plus souvent la cellule réarrange le locus kappa en premier. Si nécessaire la cellule réarrangera aussi le locus lambda. Sont figurés sur cette figure les réarrangements d'un seul allèle Kappa. Les flèches noires indiquent les réarrangements primaires, les flèches vertes les réarrangements secondaires dans la cellule B qui possède un ou plusieurs réarrangements non productifs, les flèches rouges les corrections du réarrangement dans la cellule ayant un ou plusieurs réarrangements productifs. κ^+ : réarrangement productif, κ^- : réarrangement non productif, RS : délétion ou inversion les régions RS en V κ ou iRS, λ^+ : réarrangement productif, λ^- : réarrangement non productif.

Source : adaptée de Luning Prak et coll., (45)

3. La transduction de signal via le BCR, et les principaux co-sigaux associés à la maturation B post-médullaire

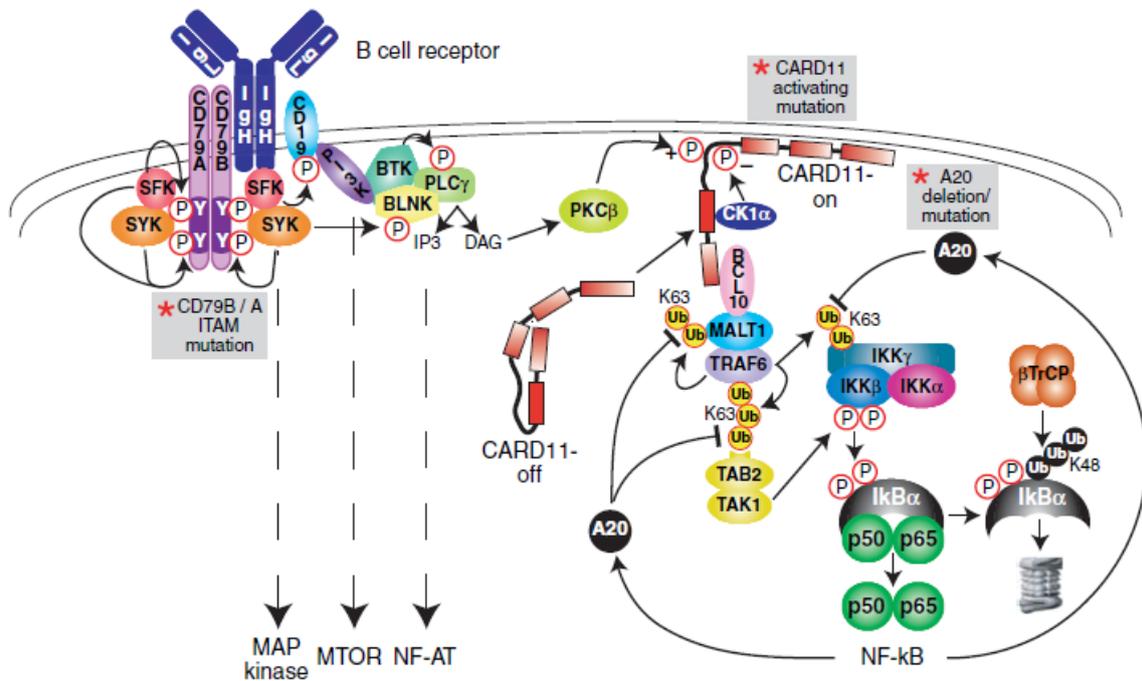


Figure 17 : activation de la voie classique de NF-kappa B par le BCR

Voir texte pour explications. Source : (47)

Comme schématisé sur cette figure extraite d'une revue écrite par Lenz et Staudt en 2010 (47), le pontage du BCR par l'antigène induit une cascade de signalisation grâce aux chaînes alpha et beta (CD79a et CD79b), lesquelles sont connectées aux tyrosine kinases Syk et Lyn (non figuré sur ce schéma). La chaîne de transduction de signal mobilise les intermédiaires CARD11, BCL10, MALT1 et TRAF6, conduisant à l'activation du complexe IKK (I kappa B kinase) grâce à une succession d'ubiquitinations. L'activation d'IKK est responsable de la phosphorylation de d'I-kappa B alpha, l'inhibiteur des complexes de la voie classique NF-kappa B (complexes p65/p50). La phosphorylation de I-kappa B alpha libère les complexes p65/p50 qui transloquent dans le noyau, induisant la transcription de nombreux gènes de la réponse immune telles des cytokines, des chimiokines, ainsi que des protéines anti-apoptotiques et des protéines de la prolifération cellulaire.

La maturation lymphocytaire B requiert des co-sigaux du microenvironnement, le principal d'entre eux étant le signal CD40 délivré par les cellules T CD4 éduquées au même antigène que le lymphocyte B.

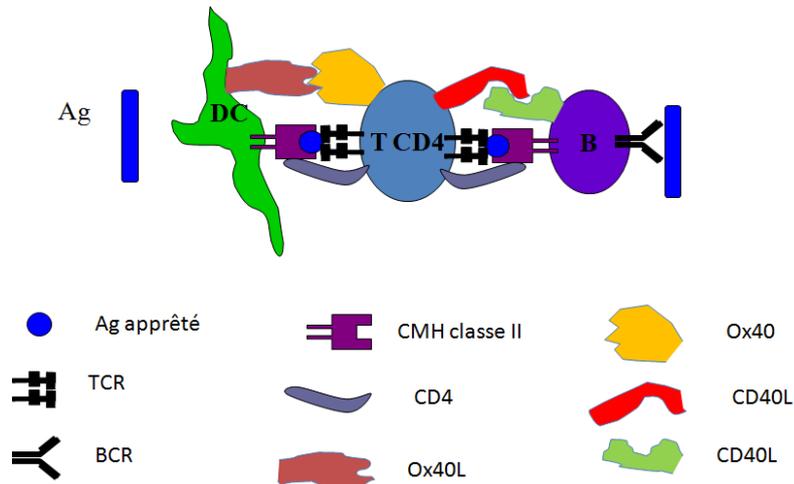


Figure 18 : coopération entre les cellules dendritiques présentatrices de l'antigène, les cellules T CD4 auxiliaires et les lymphocytes B.

Les cellules dendritiques (DC) présentent l'antigène aux cellules T CD4 (T CD4) assurant ainsi l'éducation du lymphocyte T CD4. Les cellules B (B) ayant spécifiquement reconnu l'antigène par leur BCR l'internalisent et le présentent aux cellules T CD4 éduquées pour le même antigène. Les cellules T CD4 délivrent aux cellules B un co-signal par interaction CD40-CD40L.

Comme montré ci-dessous, l'activation via CD40 induit l'activation de la voie alternative de NF-kappa B avec translocation nucléaire des complexes RelB/p52 par phosphorylation et dégradation partielle de p100. Ces complexes de la voie alterne de NF-kappa B régulent également les gènes de la survie cellulaire et de l'inflammation.

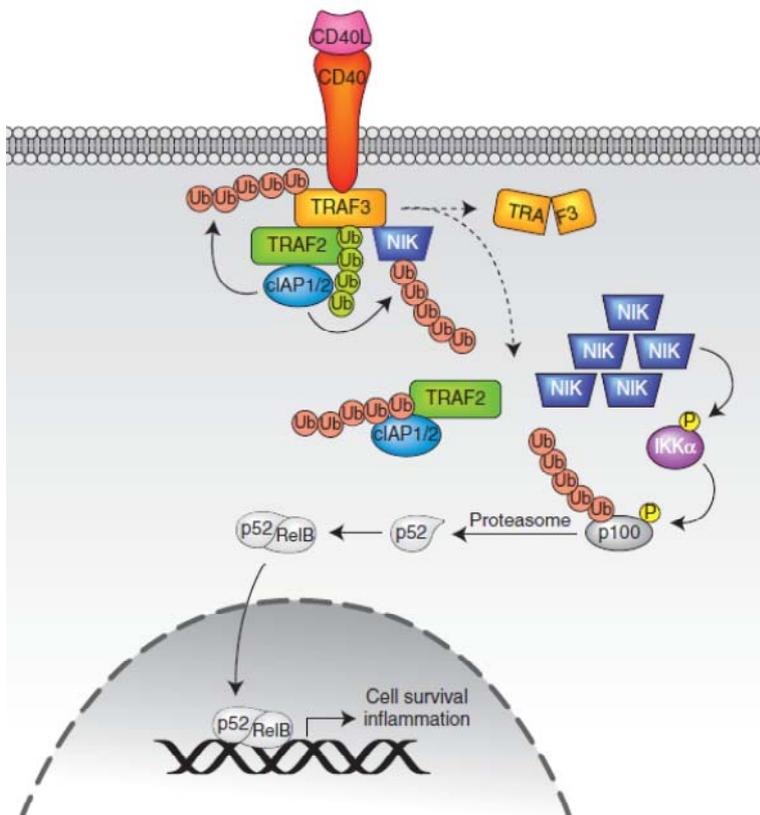


Figure 19 : voie de transduction du CD40

Voir texte pour explications.
 Source : (48)

Un autre co-signal important pour les lymphocytes B est celui délivré par les TLR (Toll Like Receptor). Les TLR sont des récepteurs dits « pattern-recognition receptors (PRR) », qui reconnaissent des produits (ou motifs moléculaires) conservés et partagés par les agents microbiens et que l'on désigne par le terme PAMP (pathogen-associated molecular patterns, PAMP). À ce jour, 10 TLR fonctionnels ont été identifiés chez l'homme. Chaque TLR détecte des composants microbiens distincts provenant de bactéries. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 sont localisés à la surface cellulaire et reconnaissent principalement des composants de la membrane microbienne alors que TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont exprimés dans des vésicules intracellulaires et reconnaissent des acides nucléiques (CpG). Excepté le TLR3, tous les TLR utilisent l'adaptateur MyD88 pour activer la voie classique de NF-kappa B (49).

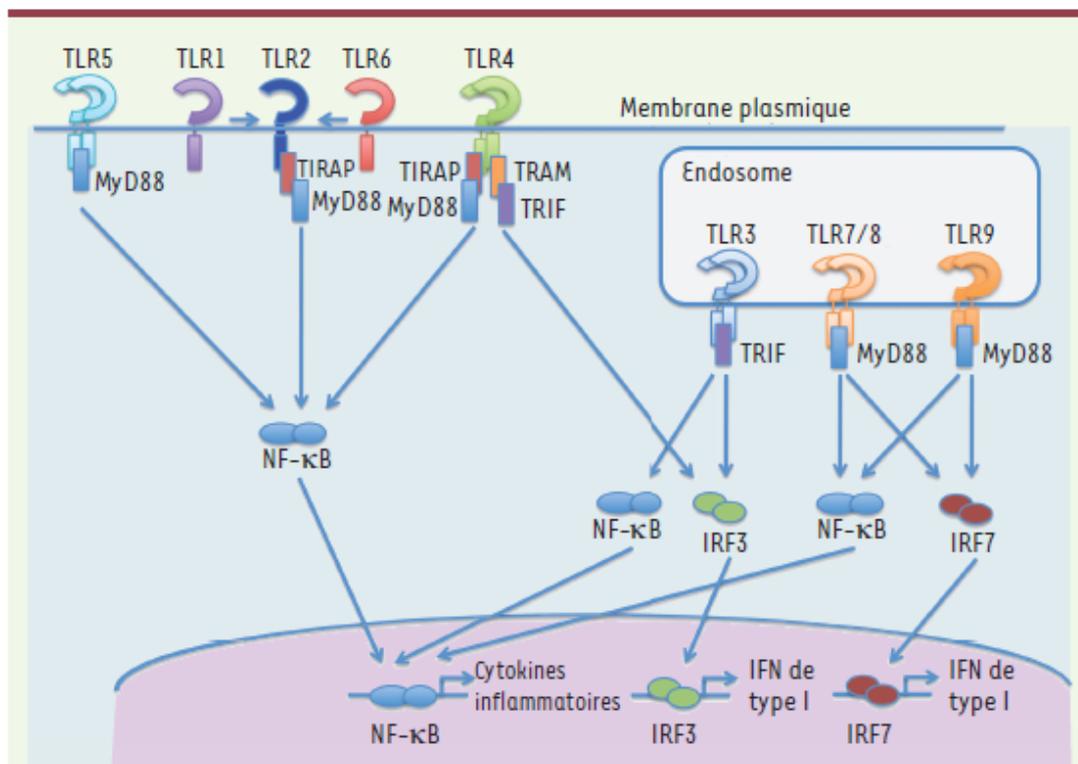


Figure 1. Signalisation par les TLR. Chacun des TLR déclenche des voies de signalisation redondantes et distinctes. L'engagement par les PAMP induit un changement de conformation des TLR permettant une interaction homo- ou hétérotypique des TLR et le recrutement de molécules adaptatrices telles que MyD88, TRAM, TRIF ou TIRAP. TLR5 recrute MyD88 pour activer NF-κB et induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Les hétérodimères TLR1-TLR2 et TLR6-TLR2 induisent également l'activation de NF-κB après recrutement de TIRAP et de MyD88. TLR4 active NF-κB à partir de la membrane plasmique via le recrutement de TIRAP et MyD88 ; parallèlement, TRAM et TRIF sont recrutées pour activer IRF3 et l'expression d'IFN de type I. Parmi les TLR endolysosomiaux (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9), TLR3 recrute de manière exclusive TRIF pour activer IRF3 et NF-κB alors que TLR7, TLR8 (chez l'homme) et TLR9 recrutent MyD88 pour activer NF-κB et IRF7, responsable de l'expression d'IFN de type I.

Figure 20 : signalisation par les TLR. Source : texte et légende d'après (49)

4. Maturation lymphocytaire B post-médullaire

Le système immunitaire est à la fois liquide (sang et lymphe) et solide (organes lymphoïdes secondaires). Ainsi, les organes lymphoïdes sont en relation fonctionnelle avec le réseau des capillaires sanguins et le réseau lymphatique pour les ganglions du même nom. En règle, la maturation lymphocytaire B en réponse à l'antigène a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires, et les cellules recirculantes sont à l'état quiescent. Ainsi, la réponse immune s'élabore au niveau locorégional dans les organes lymphoïdes secondaires, dans le territoire de drainage lymphatique de la porte d'entrée de l'antigène pour les ganglions lymphatiques, dans le tissu lymphoïde associé aux muqueuses pour les muqueuses, notamment intestinale et pulmonaire, dans les amygdales et l'anneau de Waldeyer pour la porte d'entrée oropharyngée et dans la rate pour la contamination sanguine directe.

4.1 Les organes lymphoïdes secondaires

Bien que différents par leur localisation et leurs relations aux vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que par les structures associées (la pulpe rouge de la rate par exemple), les organes lymphoïdes secondaires présentent tous un même schéma d'organisation avec l'existence de follicules primaires et secondaires au sein d'un territoire interfolliculaire. Le prototype d'un tel schéma organisationnel est le ganglion lymphatique, que nous décrirons plus avant.

4.1.1 Les Ganglions lymphatiques

Ce sont des organes arrondis réniformes entourés d'une capsule de tissu conjonctif et situés sur les ramifications des vaisseaux lymphatiques. La lymphe est amenée par les voies lymphatiques afférentes. Elle se déverse dans les sinus ganglionnaires et ressort du ganglion par le vaisseau lymphatique efférent au niveau du hile (figure 21 ci-après).

Le parenchyme ganglionnaire comprend une zone médullaire à proximité du hile, claire peu dense en cellules et riche en plasmocytes à IgM de la réponse immune primaire et une zone corticale dans laquelle sont retrouvés les follicules lymphoïdes de deux types, primaires et secondaires. Les follicules lymphoïdes primaires sont constitués de cellules B naïves quiescentes supposées recirculantes, enchâssées dans un réseau peu dense de cellules folliculaires dendritiques (CDF). Les CDF attirent les cellules B naïves et les cellules B activées dans les follicules en sécrétant la chimiokine CXCL13 qui est reconnue par le

récepteur CXCR5 sur les cellules B (50, 51). Les follicules secondaires sont donc développés à partir d'un follicule primaire colonisé par quelques cellules B ayant rencontré l'antigène en zone interfolliculaire dans un contexte dépendant du lymphocyte T (réponse immune primaire T-dépendante). Ces quelques lymphocytes B, commis dans la réponse immune B secondaire T-dépendante, prolifèrent très rapidement (1 mitose toutes les 6h) formant un agrégat dense oligoclonal de centroblastes. Cet agrégat, première étape de formation du centre germinatif, repousse en périphérie les lymphocytes B du follicule primaire, lesquels forment alors le manteau ou couronne folliculaire. Les centroblastes forment dans le centre germinatif un territoire appelé zone sombre. La différenciation des centroblastes en centrocytes peu ou pas proliférant aboutit à la polarisation du centre germinatif avec deux territoires, la zone sombre déjà citée et la zone claire, territoire des centrocytes. Zones sombre et claire sont positionnées de tel sorte la zone claire est contre la partie la plus épaisse du manteau et au plus près de la capsule ganglionnaire. La différenciation du centrocyte se termine hors du centre germinatif au sein de la zone marginale, qui, dans les ganglions, est située sous la capsule (figure 22).

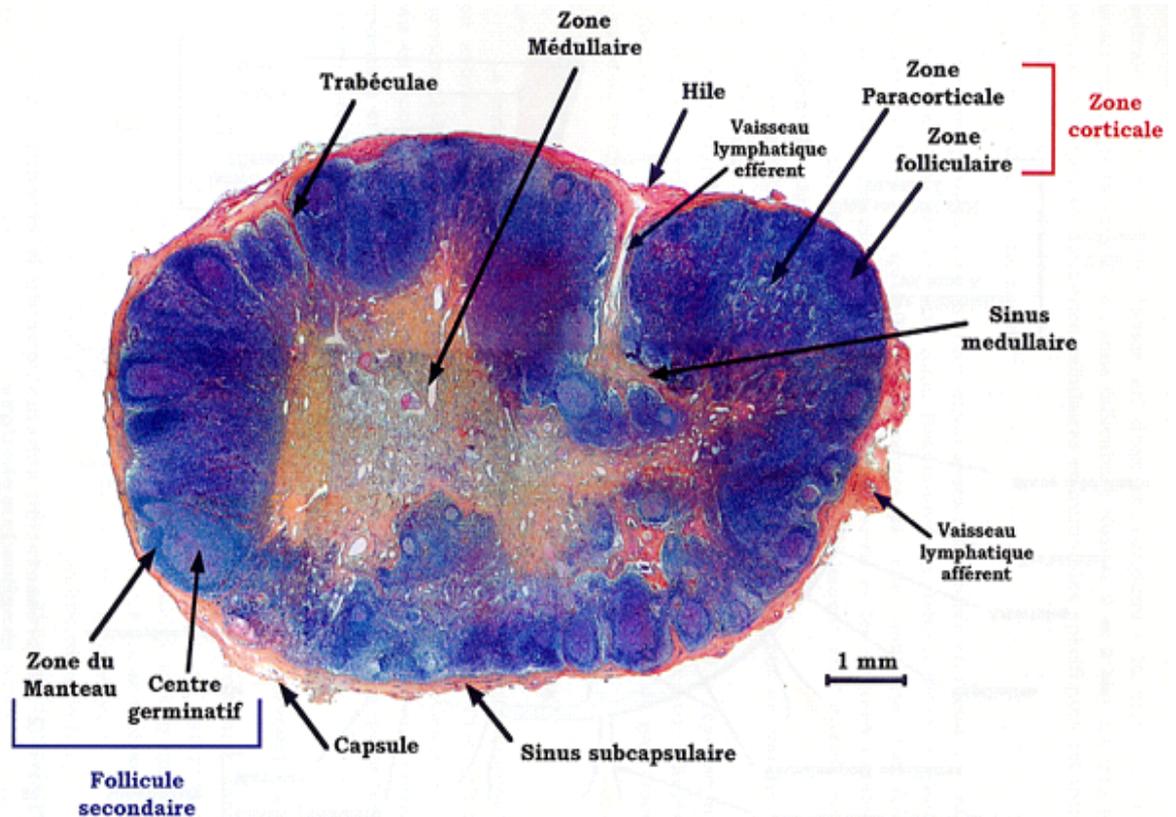


Figure 21 : coupe d'un ganglion lymphatique.

Source :(52)

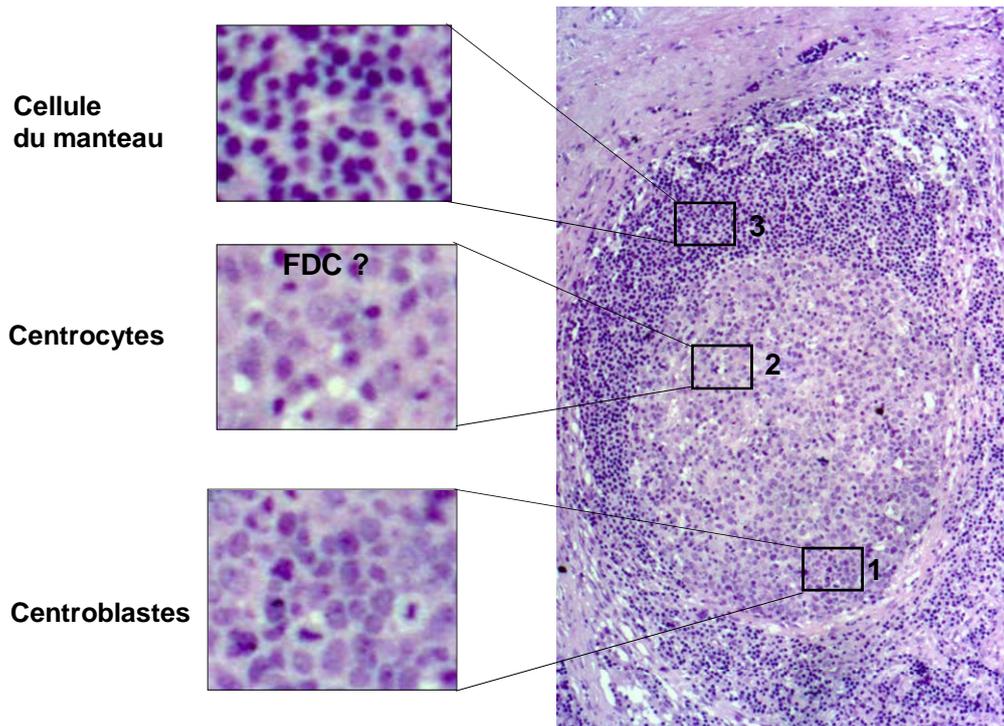


Figure 22 : histologie d'un follicule lymphoïde secondaire

Le follicule est formé d'une zone sombre (1) surmontée d'une zone claire (2), le tout est entouré de la zone du manteau (3). Chaque carré de gauche montre la morphologie cellulaire en rapport. Le carré du milieu montre une cellule qui n'est pas un centrocyte mais sans doute une cellule folliculaire dendritique.

Source : résultats non publiés, J Feuillard/ M Raphaël, 1991.

Ainsi, les follicules primaires et secondaires sont des territoires lymphoïdes enrichis en lymphocytes B, ils contiennent néanmoins des lymphocytes T, des macrophages, des cellules dendritiques présentatrices de l'antigène et des cellules folliculaires dendritiques. Réciproquement, les zones interfolliculaires sont enrichies en lymphocytes T, mais, comme évoqué ci-dessus pour la réponse immune primaire, contiennent également quelques lymphocytes B.

4.1.2 La rate

La rate est située dans la partie supérieure gauche de l'abdomen, reliée au foie par le système porte. Deux grands territoires sont décrits, la pulpe rouge et la pulpe blanche. La pulpe rouge essentiellement une fonction de filtrage et d'épuration des particules étrangères et des débris cellulaires et des cellules sénescents véhiculés par le sang. La pulpe blanche est la partie « lymphoïde » de la rate. Elle entoure les ramifications de l'artère splénique, formant le manchon péri-artériolaire. Comme dans le ganglion lymphatique, on retrouve une zone

interfolliculaire riche en lymphocytes T et des follicules primaires et secondaires riches en cellules B. La zone marginale est particulièrement bien délimitée dans cet organe (figure 23).

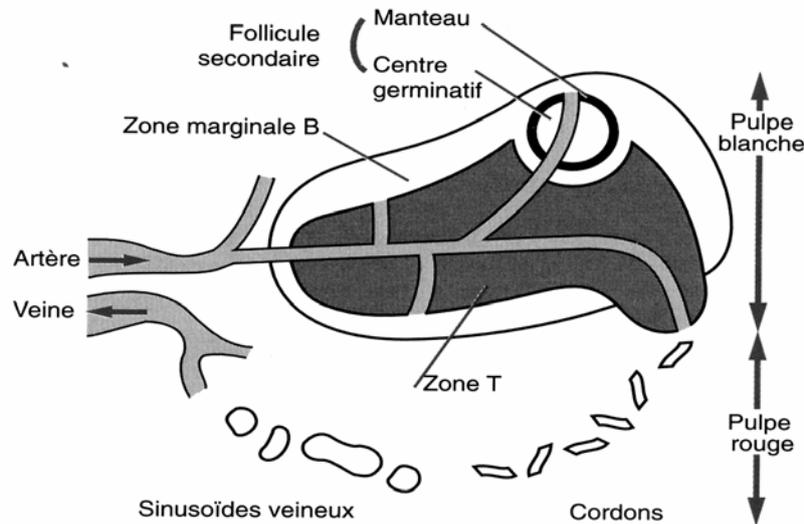


Figure 23 : représentation schématique de la structure de la rate

L'antigène drainé par voie sanguine active le lymphocyte B et T dans les zones B et T respectivement. Les anticorps et les cellules effectrices sont drainés par les cordons et les veines efférentes.
Source : d'après le livre Les lymphomes de Solal-Céligny et al. (53)

4.1.3 Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses

Les muqueuses sont exposées à de nombreux agents exogènes provenant de l'air, de la nourriture ou de la flore microbienne. Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) est très proche du milieu extérieur et assure une réponse immune locale permettant une protection efficace, avec entre autre la production de plasmocytes sécrétant une IgA. En masse, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses constituent la majeure partie du tissu lymphoïde. Pour le moins, on décrit :

- les GALT, pour Gut-Associated Lymphoïd Tissues, autrement dit les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses du tractus digestif, localisé dans les plaques de Peyer
- les NALT (Nasal-associated lymphoïd Tissu), tissu lymphoïde associé aux muqueuses nasales (anneau de Waldeyer)
- les BALT (Bronchial-Associated lymphoïd Tissu), tissu associé à la muqueuse bronchique.

Ces tissus présentent deux grandes organisations anatomiques :

- le tissu lymphoïde diffus constitué de lymphocytes B, de plasmocytes insérés entre

les cellules épithéliales et quelques lymphocytes T. Ce tissu correspond à des structures non statiques se formant en réponse à une infection et disparaissant en l'absence de stimulation

- et les nodules lymphoïdes similaires aux follicules lymphoïdes des ganglions avec des centres germinatifs mais non branchés sur la circulation lymphatique.

Le point commun à ces tissus lymphoïdes associés aux muqueuses est qu'ils ne possèdent pas de délimitation nette et sont parties prenantes de l'organe au sein duquel ils se développent.

4.1.4 Les amygdales

Regroupées par certains auteurs avec le tissu lymphoïde associé aux muqueuses, elles s'en distinguent néanmoins par leur identification anatomique sans ambiguïté comme organe lymphoïde appendu aux parois postérieures de la cavité buccale et aux espaces nasopharyngés à l'entrée de l'œsophage (figure 24). Elles sont délimitées par un épithélium malpighien non kératinisé creusé pour leur face externe de profondes cryptes plongeant dans le tissu lymphoïde. On distingue les amygdales palatine, linguales, tubales et pharyngiennes, ces dernières formant les végétations adénoïdes.

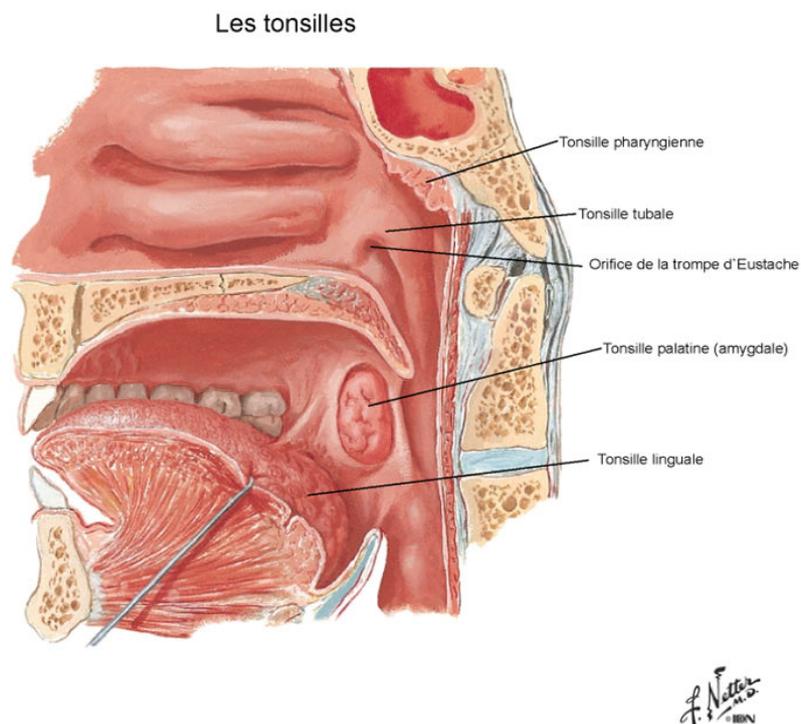


Figure 24 : anatomie des amygdales

Source : <http://www.sirtin.fr/2008/03/24/>

4.2 Les compartiments cellulaires

4.2.1 Les cellules B transitionnelles

Au sortir de la moelle osseuse, la cellule B que nous avons qualifiée de mature, ne fait que débiter un processus de différenciation comprenant de nombreuses étapes différentes. Cette cellule B émergente est appelée cellule transitionnelle et est caractérisée par un haut niveau d'expression des marqueurs CD24 et CD38. Ces cellules B non encore fonctionnelles doivent subir une étape de maturation qui déterminera leur destin. Les cellules transitionnelles migrent dans la rate pour recevoir un signal par le BCR. En l'absence d'un tel signal, la cellule mourra par apoptose. Chez la souris, il a été montré qu'un signal Notch2 est important pour l'engagement dans la différenciation en cellule B de la zone marginale T-indépendante (réponse aux polysaccharides bactériens notamment). Il est vraisemblable que la voie Notch2 soit impliquée dans ce processus de différenciation chez l'homme également. En l'absence de signal Notch2 et en présence d'un signal BCR « fort », les cellules B se différencient en cellules folliculaires engagées dans une réponse T dépendante (54). La cellule B folliculaire devient alors recirculante dite naïve (ou pré-centre germinatif).

4.2.2 Les cellules B naïves folliculaires

Les cellules B naïves constituent plus de la moitié des cellules B recirculantes dans le sang. Elles expriment de haut niveau d'IgM et d'IgD et sont CD38 négatives. Elles n'expriment pas le marqueur CD27, et sont caractérisées par l'expression du transporteur ABCB1 (ATP-binding cassette sub-family B member 1). Ce transporteur est impliqué dans la résistance aux drogues multiples et responsable de l'efflux du colorant de Hoechst ou de la rhodamine en cytométrie de flux (55).

Les phases initiales de la réponse immune B ont particulièrement bien été décrites dans la rate de rongeurs (56). Les cellules B folliculaires naïves résident dans la zone marginale. Quelques heures après introduction de l'antigène, les cellules B folliculaires spécifiques localisées dans la zone marginale sont activées via leur BCR. Les cellules B folliculaires activées de la zone marginale par l'antigène peuvent être co-activées par les complexes immuns grâce à leur récepteur au C3d du complément (CD21). Les cellules dendritiques myéloïdes (cellules dendritique de type 1 ou DC1) localisées dans la zone

marginale délivrent un co-signal aux cellules B de la zone marginale en sécrétant la cytokine BAFF. Ces cellules B migrent dans la zone interfolliculaire riche en cellules T (figure 25).

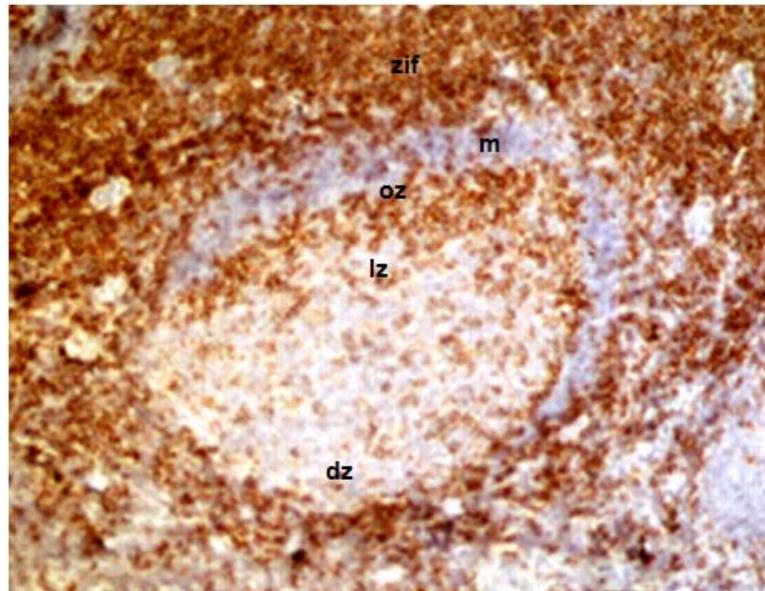


Figure 25 : immunomarquage CD4 sur coupe de ganglion lymphatique avec hyperplasie folliculaire

Marquage indirect avec révélation peroxydase et contre-coloration à hémalum (Les cellules marquées sont en marron, les cellules négatives sont bleues). Cet immunomarquage montre que les lymphocytes T CD4 sont prédominants dans la zone inter-folliculaire. Les lymphocytes T CD4 folliculaires s'accumulent dans la partie apicale de la zone claire contre la outer zone.

m : manteau ; dz : zone sombre (dark zone), lz : zone claire (light zone), oz : outer zone ; Zif : zone inter-folliculaire.

Source : résultats non publiés, J Feuillard/ M Raphaël, 1996.

En territoire T, les cellules B folliculaires activées de la zone marginale peuvent soit transporter l'antigène aux cellules folliculaires dendritiques du centre germinatif, soit dégrader cet antigène pour le présenter dans le contexte du CMH classe II. Il s'établit alors une coopération entre les cellules B activées et les cellules T CD4 reconnaissant l'antigène de même origine dans le contexte du CMH classe II. Ces cellules T CD4 délivrent un co-signal aux cellules B par interaction CD40-CD40L. Les cellules B activées coopèrent également avec les cellules NKT par le CD1d. Ces cellules B migrantes activées deviennent plus grandes et se divisent rapidement, formant les B-blastes. Après 3 jours, les cellules B forment de petits amas de plasmocytes IgM à courte durée de vie dans la pulpe rouge pour la rate et dans la medulla pour les ganglions lymphatiques (figure 26) (57). Cette IgM est en règle peu affine pour l'antigène et souvent polyréactive, à l'origine de la formation des complexes immuns. Comme évoqué ci-dessus, quelques B-blastes vont migrer dans les follicules primaires et se différencier en centroblastes, initiant la formation du centre germinatif.

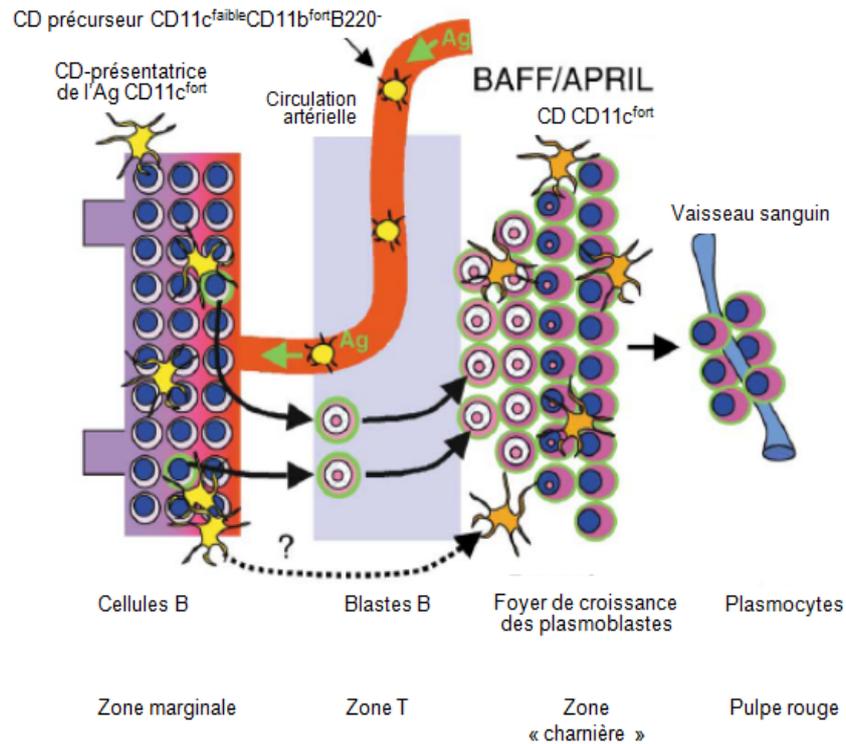


Figure 26 : Les 4 microenvironnements de la réponse immune extrafolliculaire

Lorsque les cellules B de la zone marginale se lient spécifiquement aux antigènes (Ag) libres du sang ou portés par les cellules dendritiques (CD) précurseurs (B220⁻CD11c^{faible}CD11b^{fort}), elles migrent rapidement dans la zone T. Ces cellules deviennent alors actives en interagissant avec les cellules T apprêtées et reçoivent les signaux provoquant leur transformation en plasmoblastes. Les plasmoblastes migrent ensuite vers le foyer extra-folliculaire où ils prolifèrent au contact des cellules dendritiques CD11c^{fort} et 3 jours après environ, ils se différencient en plasmocytes. La pulpe rouge de la rate possède une capacité limitée à maintenir, pour de longues périodes, une proportion des plasmocytes nouvellement générés.

Source : d'après MacLennan et al. 2002 (56).

4.2.3 Les cellules B du centre germinatif.

La migration du B-blaste dans le follicule primaire implique ce récepteur CXCR5 (initialement appelé BLR-1) (50). Comme évoqué ci-dessus, après une phase d'expansion centroblastique initiale, le centre germinatif se compartimente en deux territoires, la zone sombre et la zone claire. Ces deux territoires peuvent se lire comme le reflet de deux stades de différenciation B, les centroblastes dans la zone sombre et les centrocytes dans la zone claire, les seconds dérivant des premiers. Cette territorialisation correspond aussi à une répartition différentielle des cellules folliculaires dendritiques (CDF). Les CDF forment un réseau dense dans la zone claire et lâche dans la zone sombre (figure 27). Les CDF captent les complexes immuns par leurs récepteurs aux parties constantes des chaînes lourdes des immunoglobulines. La fonction des CDF est de présenter les complexes immuns aux

centrocytes sous forme native, complexes immuns provenant de la formation du complexe antigène-anticorps de la réponse immune primaire contre l'antigène de même origine (cognate antigen). Autrement dit, la réponse immune primaire a pour résultat de précharger les CDF en complexes immuns enrichis en antigène de même origine qui, ultérieurement, serviront à la sélection du centrocyte ayant subi le processus d'hypermutation somatique des régions variables des immunoglobulines. En réalité, pour survivre, le centrocyte a besoin de rencontrer l'antigène, libre ou sous forme de complexe immun et d'un signal CD40 délivré par un lymphocyte T. Les CDF agissent plutôt comme des concentrateurs d'antigènes lorsque ceux-ci sont peu abondants.

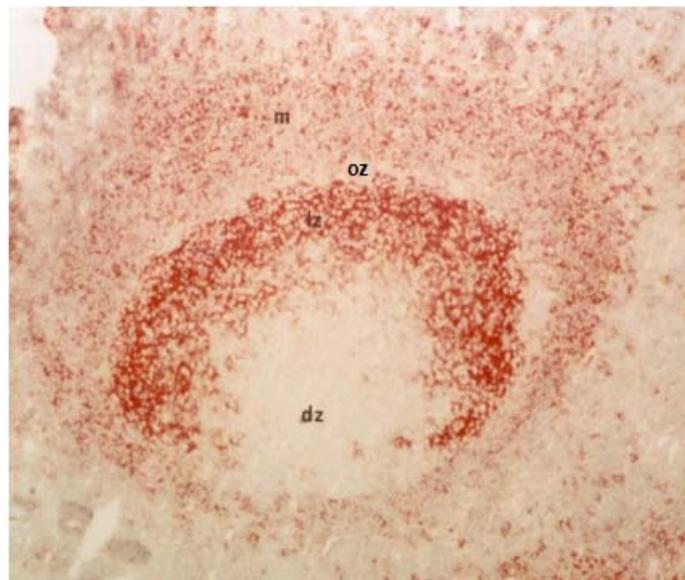


Figure 27 : immunomarquage CD23 sur coupe de ganglion lymphatique avec hyperplasie folliculaire

Marquage indirect avec révélation APAAP (Les cellules marquées sont en rouge). Ce marquage met en évidence l'expression du CD23 sur les cellules folliculaires dendritiques. Ce marquage CD23 sur les CDF a un aspect en réseau typique, dû aux expansions de la membrane plasmique de ces cellules. Le réseau dense des CDF dans la zone claire donne un aspect de positivité très forte. Le réseau lâche dans le manteau donne un aspect de positivité plus faible (ce réseau des CDF est aussi retrouvé dans les follicules primaires, non montré). m : manteau ; dz : zone sombre (dark zone), lz : zone claire (light zone), oz : outer zone.

Source : résultats non publiés, J Feuillard/ M Raphaël, 1996.

Les centroblastes sont des cellules B proliférant à très haute vitesse. La quasi-totalité de ces cellules expriment donc le marqueur de prolifération Ki67 (figure 28). Egalement, ces cellules n'expriment pas la protéine anti-apoptotique Bcl2. Elles expriment les marqueurs CD10, CD38 et CD77 ainsi que le facteur transcriptionnel Bcl6. Au plan génétique, les centroblastes sont soumis à deux événements majeurs, l'un obligatoire, le processus d'hypermutation somatique des régions variables des gènes des immunoglobulines, et l'autre

facultatif, la commutation de classe (cf ci-après pour détails moléculaires de ces deux processus). Durant cette phase, l'immunoglobuline de surface est peu ou pas exprimée. Le processus d'hypermutation somatique altère très significativement et de façon aléatoire l'affinité de l'immunoglobuline pour l'antigène contre lequel elle a été sélectionnée, ce qui génère un nouveau répertoire de grande diversité.

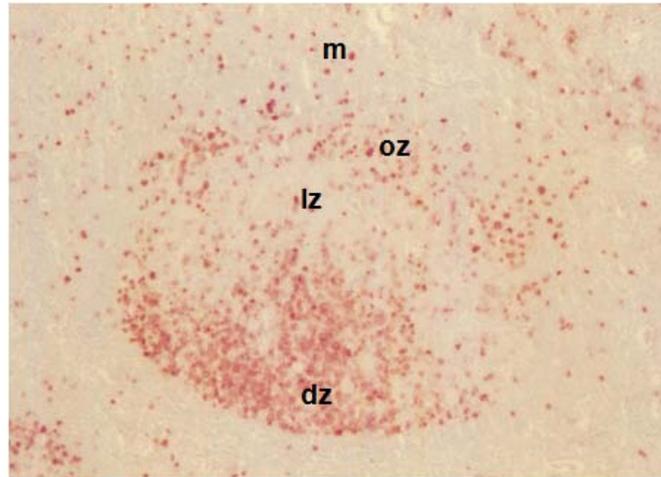


Figure 28 : marquage Ki67 (marqueur de prolifération) sur coupe de ganglion lymphatique avec hyperplasie folliculaire :

Marquage indirect avec révélation APAAP (Les cellules marquées sont en rouge). Ce marquage met en évidence l'index prolifératif très élevé des cellules dans la zone sombre. Il montre également une certaine réactivation de la prolifération cellulaire au pôle apical de la zone claire contre la outer zone (territoire riche en lymphocytes T folliculaires). m : manteau ; dz : zone sombre (dark zone), lz : zone claire (light zone), oz : outer zone.

Source : résultats non publiés, J Feuillard/ M Raphaël, 1996.

Le centroblaste se différencie en centrocyte à la frontière de la zone sombre et de la zone claire, réexprimant alors une immunoglobuline de surface à taux élevé. A ce stade, la cellule B meurt par apoptose à moins qu'elle ne soit sauvée par reconnaissance de l'antigène présenté par la CDF sous forme de complexe immun natif. Ce processus a pour résultat de sélectionner les lymphocytes B dont l'immunoglobuline altérée présente une affinité élevée pour l'antigène (figure 29).

En effet, une question est de savoir comment le BCR muté peut avoir accès aux épitopes du complexe immun présenté par la CDF puisque ces deux immunoglobulines résultent du même réarrangement VDJ pour la chaîne lourde et VJ pour la chaîne légère, et ont donc des paratopes apparentés, l'un non muté pour le complexe immun et l'autre muté pour l'Ig du centrocyte. Il faut alors imaginer que l'Ig du centrocyte a la capacité de déplacer l'IgM du complexe immun. Cela implique nécessairement que l'affinité de l'Ig du centrocyte

est supérieure à celle de l'IgM provenant de la réponse immune primaire. De fait, plus de 90% des cellules B du centre germinatif meurent par apoptose, et sont épurées par les macrophages présents dans le centre germinatifs.

Comme le centroblaste, le centrocyte exprime les marqueurs CD10, CD38 et Bcl6. Par contre, l'expression de CD77 diminue et la prolifération cellulaire est très ralentie ou arrêtée. La différenciation du centrocyte nécessite la coopération T – B avec interaction CD40-CD40L. Les cellules T du centre germinatif, dites cellules T folliculaires, sont des lymphocytes T CD4 localisées essentiellement contre la zone claire (figure 25), ayant un phénotype très particulier avec expression du CD10 et de CXCL13, ainsi que du facteur nucléaire BCL6 et le CD40L.

Classiquement, le centrocyte termine sa maturation soit en devenant un lymphocyte B mémoire dans la zone marginale, soit en s'engageant dans la différenciation plasmocytaire (figure 29) (56). Nous verrons dans la section suivante que les travaux du groupe de JC Weill et CA Reynaud changent un peu cette vision.

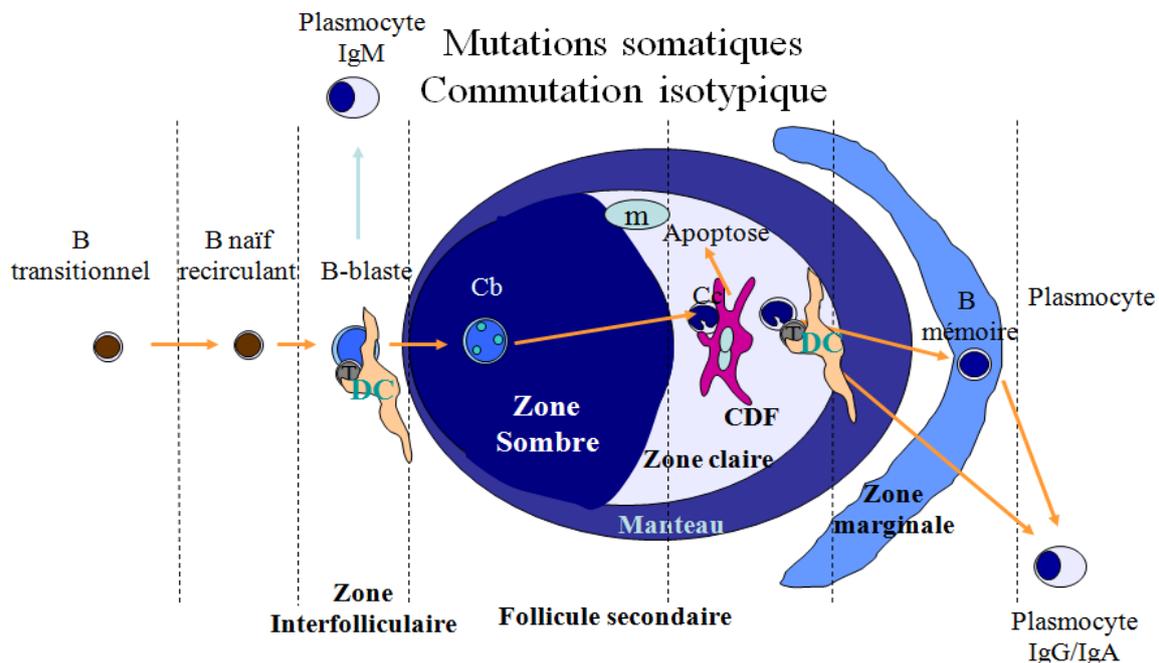


Figure 29 : représentation de la maturation T dépendante des lymphocytes folliculaires au travers du centre germinatif.

Après une phase de prolifération très rapide au cours de laquelle ils sont soumis au processus d'hypermutation somatique et la commutation isotypique, les centroblastes (Cb) mûrissent en centrocytes qui meurent par apoptose à moins qu'ils ne soient sauvés par l'antigène présenté par les CDF (Cellule Folliculaire Dendritique). Ils peuvent alors coopérer avec les cellules T folliculaires pour se différencier ensuite en lymphocytes B mémoires ou en plasmocytes.

Les cellules B du centre germinatif expriment le marqueur Bcl6. Bcl6 fonctionne comme un facteur transcriptionnel répresseur et est nécessaire à la formation des centres germinatifs. Bcl6 et le facteur Blimp-1 s'inhibent réciproquement. La diminution de l'expression de Bcl6 permet l'activation du facteur Blimp-1 qui en retour réprime Pax5. La répression de Pax5 libère l'activité du facteur transcriptionnel XBP1, promouvant la différenciation plasmocytaire (figure 30).

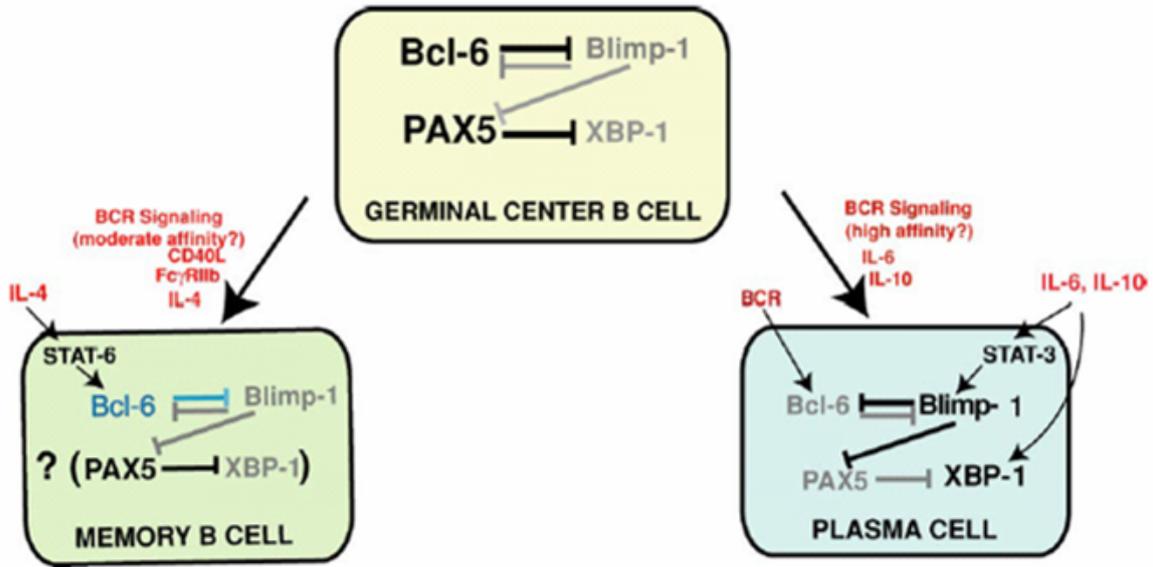


Figure 30 : rôle des facteurs transcriptionnels Bcl6, Blimp1, Pax5 et XBP1 dans la différenciation lymphocytaire B post-centre germinatif

Voir texte pour explication. Source : (58)

4.2.3.1 Le processus d'hypermutation somatique

Après la diversité combinatoire et la diversité jonctionnelle, le processus d'hypermutation somatique constitue le troisième mécanisme de diversité. Il consiste en des mutations ponctuelles sur les segments codants de la région variable des chaînes lourdes et des chaînes légères. Les mutations se produisent à une fréquence supérieure à celle des mutations habituellement observées dans les autres gènes (une mutation pour 1000pb ce qui est un million de fois au taux de mutations spontanées (59), d'où le nom d'hypermutation). Les études du groupe de T Honjo d'une part et de A Durandy d'autre part ont démontré que la protéine AID (Activation Induced Deaminase) est absolument requise pour ce processus d'hypermutation somatique (60).

AID (Activation-induced deaminase)

AID agit par désamination des déoxycytosines sur l'ADN mono-brin et l'ADN bicaténaire super enroulé. Elle présente un domaine catalytique proche à celui des membres des deaminases cytosine ou cytidine de la famille APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like). Ce domaine catalytique se lie à l'ADN à proximité des résidus cytosine. Le domaine carboxy-terminal est essentiel pour le processus de commutation isotypique, le domaine amino-terminal est essentiel pour le processus d'hypermutation somatique. AID se fixe sur le motif WGCW (W pour A ou T), puis migre jusqu'au motif WRC (R pour G ou A). Ainsi positionnée, AID convertit un résidu cytosine en uracile (réaction de déamination). AID introduit de fait un mésappariement avec la base G du brin complémentaire.

La mécanique de l'hypermutation somatique

Le mésappariement U-G induit par AID est pris en charge selon 4 modalités différentes (figure 31) (61) :

- l'uridine peut être reconnue comme une thymidine par des ADN polymérase haute fidélité comme les polymérase δ ou ϵ ce qui aboutira lors de la synthèse d'ADN à la formation de mutations de transition: C en T ou un G en A
- Les résidus uridines sont éliminés par l'UNG (Uracil DNA glycosylase), une glycosylase appartenant à la voie de réparation BER (Base Excision Repair) en créant un site abasique. L'excision de ces sites abasiques est effectuée par les complexes de réparation/excision de la voie BER (Base excision Repair) à l'aide d'endonucléases les APE (Apurinic/Apyrimidic Endonucleases). La réplication sera effectuée par une polymérase translésionnelle, peu fidèle, comme POLQ (polymérase θ) ou REV1. Ces polymérase insèrent un nucléotide quelconque en lieu et place du site abasique. La mutation obtenue sera de type transition ou transversion.
- L'uridine présente dans l'ADN double brin est reconnue comme un mésappariement U/G par l'hétérodimère MSH2-MSH6 et devient la cible du système MMR (MisMatch Repair). L'exonucléase 1 EXO 1 supprime un fragment d'Okazaki comprenant le mismatch mais aussi des bases environnantes. Une DNA polymérase infidèle comme la POLH (polymérase η) peut alors réparer la cassure mais avec un fort taux d'erreur en créant des

mutations de type transition ou transversion (A/T vers un nucléotide quelconque). Le taux d'erreur de synthèse est plus fort en face d'une thymidine.

- Enfin le site abasique produit par l'endonucléase APE peut être pris en charge par la polymérase relativement fidèle, la POLB (polymérase β) (impliqué aussi dans le mécanisme de commutation de classe) qui restaure le C original ou une mutation de type transition.

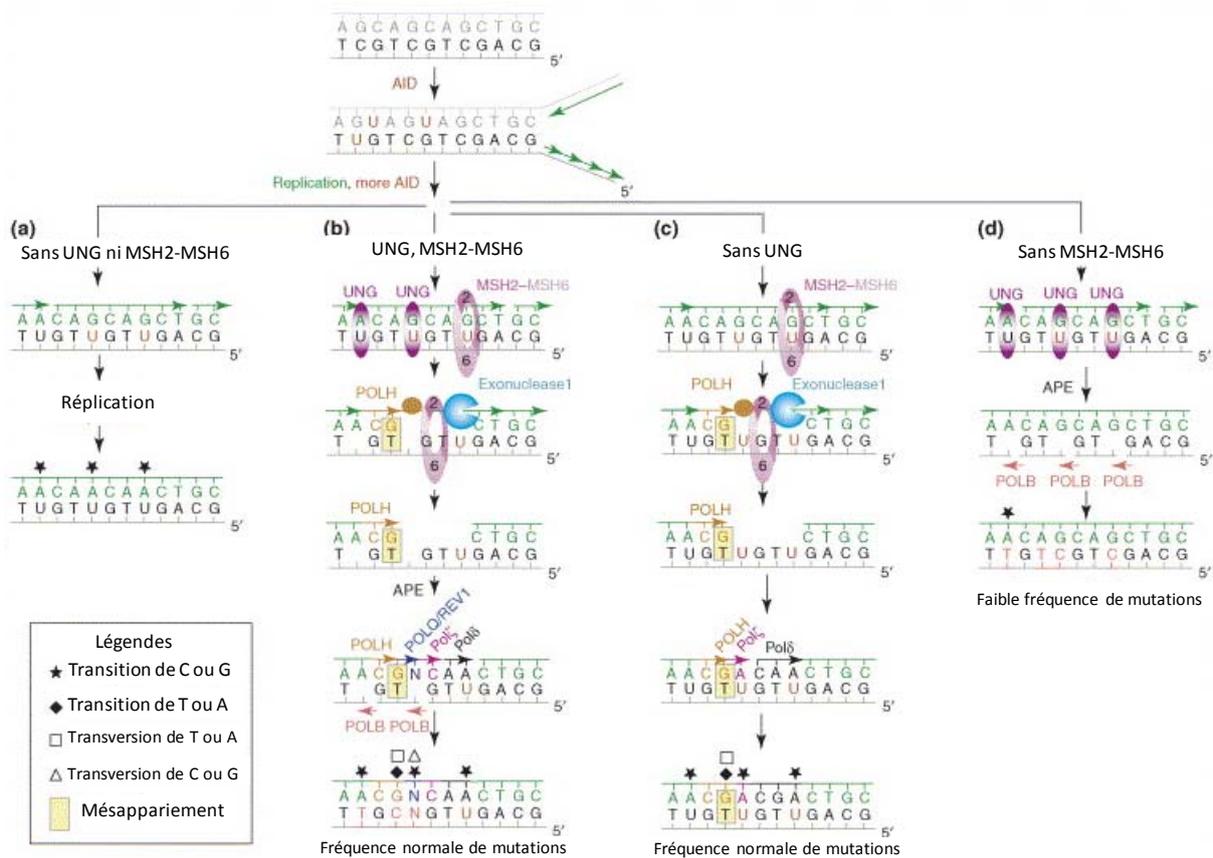


Figure 31 : les différents mécanismes de réparation mis en jeu après action de AID

Voir texte pour explication.

Source : (61)

4.2.3.2 La commutation de classe

(d'après (3, 13, 62) pour revue)

Au cours d'une réponse immunitaire, plusieurs isotypes différents de la région constante de la chaîne lourde peuvent être exprimés dans la descendance d'un lymphocyte B pour le même réarrangement VDJ. Le changement d'isotype ne survient qu'après stimulation antigénique. Il se fait par un mécanisme de recombinaison non homologue appelé

commutation isotypique ou commutation de classe, CSR (Class Switch Recombination). Ce processus est irréversible et requiert absolument AID.

La commutation isotypique est guidée par des séquences de reconnaissance, les régions Switch (S) (figure 7 schéma du locus IgH). Ce sont des séquences répétées de 20 à 80 pb disposées en tandem, riches en G et C, situées à environ 2 à 3 Kb en 5' de chacun des gènes constants à l'exception du gène constant delta. Les régions S ont une taille variant de 1 kb (S ϵ) à 10 kb (S γ 1). Elles contiennent des motifs pentamériques répétés. Par exemple la séquence S de l'IGHCM, S μ , contient le motif [(GAGCT) $_n$ (GGGGT)], n variant de 3 à 7. Les séquences S μ , S ϵ et S α contiennent les pentamères GGGGT, GAGCT et GGGCT.

Le processus est initié par une transcription germinale à partir d'un promoteur I $_H$ situé en 5' des régions switch. En réponse aux cytokines sécrétées par les cellules T, la transcription démarre à partir du promoteur et se poursuit à travers la région switch et les différents exons du gène constant, cela jusqu'au site de polyadénylation. Ces transcrits I $_H$ -S-C $_H$ s'associent au brin d'ADN matrice pour former des brins ADN-ARN et former des boucles R permettant l'accès de AID (figure 32). La modification des histones au niveau des régions S joue un rôle important dans l'accessibilité de la région. Il y a acétylation des histones dans la région cible, alors que les régions constantes en aval restent hypoacétylées. La RNAPolymérase II est aussi présente pour faciliter cette accessibilité (63).

Comme pour le processus d'hypermutation somatique, AID convertit les résidus cytosine en uridine. Les résidus uridines sont ensuite éliminés par l'UNG et les APE (Apurinic/Apyrimidic Endonucleases). Cette lésion de l'ADN est prise en charge par la voie MMR impliquant les mêmes protéines MSH2 et MSH6 que pour le processus d'hypermutation somatique. Ces enzymes génèrent des cassures simple puis double brin, ce qui induit le recrutement des facteurs de la voie NHEJ. Des synapses entre les deux régions switch clivées se forment, (la région S donneuse S μ et la région S acceptrice en amont du gène constant concerné). Le segment VDJ se retrouve contigu à un nouveau segment constant. L'ADN intermédiaire est éliminé sous forme circulaire.

La commutation de classe dépend du microenvironnement et de l'organe. Puisque pour un même réarrangement VDJ, un lymphocyte B maturant dans le ganglion tendra à exprimer un segment constant gamma alors que s'il migre dans les plaques de Peyer de

l'intestin, il exprimera plutôt une chaîne lourde alpha. Le plus souvent, les lymphocytes B maturant dans la rate ne commutent pas leur immunoglobuline.

Au plan cytokinique, l'interleukine 4 ajouté à des cellules activées par le LPS ou CD40 conduit à une commutation de classe vers IgG1 et IgE. L'interféron gamma induit une commutation vers IgG2a. Le TGF beta stimule la commutation vers IgA. Toutes ces cytokines sont principalement produites par les lymphocytes T.

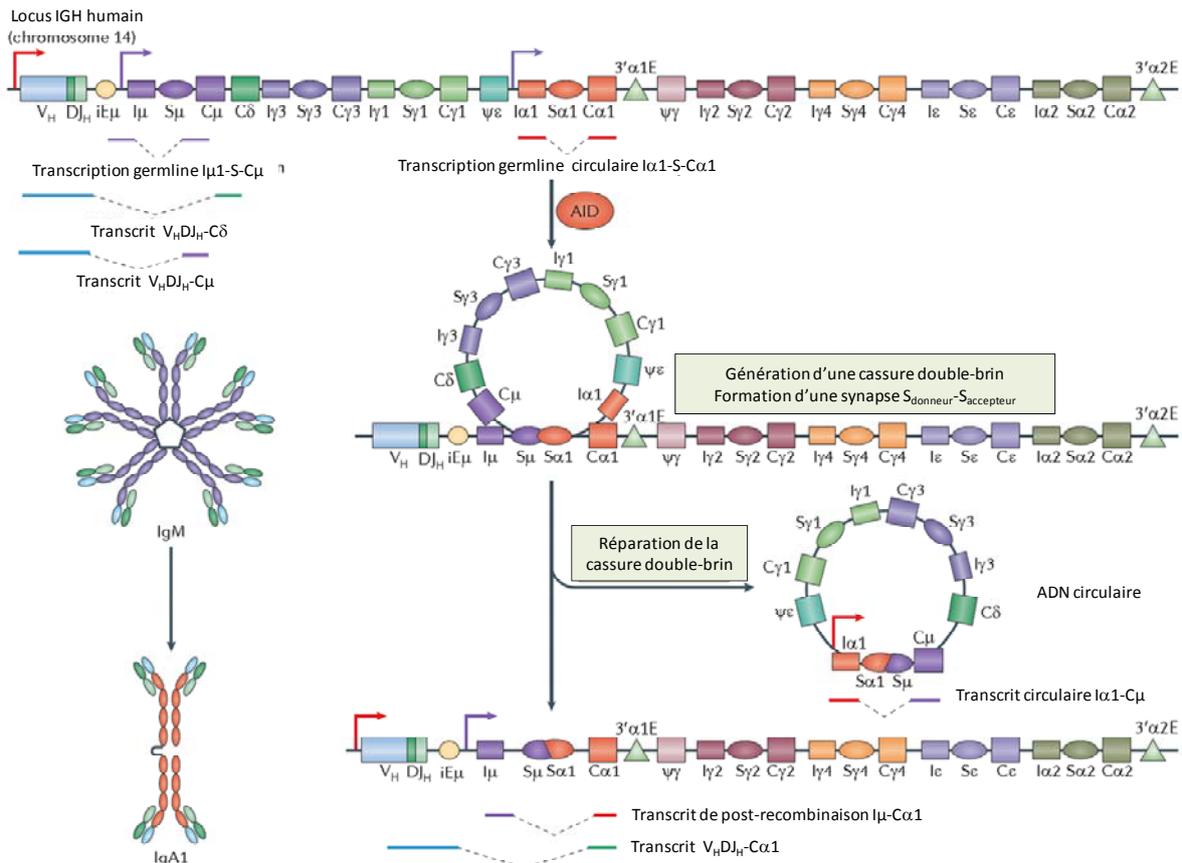


Figure 32 : mécanisme de commutation isotypique

Il assure une recombinaison – délétion entre IGHCM et un autre gène constant de la chaîne lourde à partir des régions switch (S) et nécessite une déaminase (AID) pour générer une cassure mono-brin puis double-brin dans les régions switch. Ceci aboutit à la juxtaposition du réarrangement VDJ avec un autre gène constant plus en 3' ainsi qu'à la délétion d'un ADN circulaire contenant les séquences situés entre les régions switch.

Source : (64)

Récemment, il a été montré que les cellules B du centre germinatif pouvaient être soumises à une recombinaison suicide du locus *IGHV*, recombinaison particulière qui a pour effet de supprimer l'ensemble des régions constantes jusqu'à la LCR3'IgH et dont le résultat est l'arrêt définitif de toute expression d'immunoglobulines à la surface du lymphocyte B

(65). Egalement, un article récent montre que les altérations de spécificité du BCR induites par AID peuvent induire un BCR autoréactif, mais que ce BCR autoréactif est contre-sélectionné dans le centre germinatif (66). Cette contre-sélection pourrait s'opérer par recombinaison suicide du locus IGHV (M Cogné, communication personnelle).

4.2.4 Les lymphocytes B mémoires

La traduction la plus directe de l'existence d'une mémoire immunitaire à l'antigène est la très classique séroconversion. Elle a lieu en réponse à une infection comme par l'EBV ou la toxoplasmose, traduisant à la fois la commutation de classe du type IgM à IgG le plus souvent et la capacité à répondre « plus vite et plus fort » à un nouveau contage, conférant ainsi la protection contre le germe en cause. En règle, il s'agit d'antigènes T-dépendant. Cependant, la vaccination contre des polysaccharides bactériens comme celui du pneumocoque montre que l'on peut obtenir aussi une mémoire immunitaire B contre des antigènes T-indépendants. En fait, les deux mémoires B T-dépendantes et T-indépendantes interagissent. Le groupe de T Defrance a notamment montré que la réponse B T-dépendante à l'antigène masque ou réprime la mémoire B T-indépendante (67).

Classiquement, tel que démontré chez le rongeur par plusieurs groupes dans les années 1990, et notamment par le groupe de Ian MacLennan (68), les cellules B mémoires T-dépendantes, qu'elles soient de type IgM ou IgG, proviennent des centrocytes du centre germinatif et migrent dans la zone marginale des organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules B mémoires auraient la propriété soit de se différencier en plasmocyte, soit de ré-entrer dans le centre germinatif pour subir un nouveau cycle d'hypermutation somatique. Au plan phénotypique, ces cellules sont quiescentes, expriment la protéine Bcl2 ainsi qu'un niveau élevé d'Ig de surface. Ces cellules B mémoires ont aussi la capacité à recirculer.

L'utilisation médicale la plus directe et la plus évidente du phénomène de mémoire immunitaire B est la vaccination. De ce point de vue, la vaccination dans l'enfance contre certains pathogènes comme le virus de la variole confère une immunité pour la vie. Le groupe de CA Reynaud et JC Weill a montré qu'une telle mémoire immunitaire réside dans la rate chez l'homme, avec accumulation de lymphocytes B IgG dirigés contre ce virus (69). Il était généralement admis que les lymphocytes B mémoires T-dépendant de type IgG sont de durée vie longue (68). Un tel concept a été récemment affiné, à nouveau par le groupe de CA Reynaud et JC Weill. Ce groupe a montré chez la souris que les lymphocytes B mémoires

ayant la durée de vie « la plus longue » sont de type IgM. Après une restimulation antigénique, seuls les lymphocytes B mémoires IgM auraient la capacité de ré-entrer dans le centre germinatif pour subir à nouveau le processus d'hypermutation somatique IGHV et, facultativement, subir la commutation de classe. Les lymphocytes B mémoires IgG post-centre germinatif se différencieraient immédiatement en plasmocytes IgG après restimulation antigénique (70). Ces lymphocytes B mémoires IgG, constamment renouvelés lors des restimulations antigéniques successives et résidant dans la zone marginale de la rate, seraient équivalents à ceux décrits par le groupe d'IC MacLennan dans les années 1990. Notons à ce niveau que ce travail donne les bases expérimentales cellulaires expliquant pourquoi la majorité des lymphomes B portent une IgM de surface. En effet, le seul pool de cellules B mémoires constituant un véritable compartiment de réserve serait celui des lymphocytes B mémoires IgM, lesquels seraient périodiquement resoumis aux remaniements des gènes des Ig lors des repassages dans le centre germinatif.

La caractérisation des cellules B mémoires chez l'homme et la compréhension de leurs propriétés fonctionnelles ont grandement été aidées par la découverte de l'expression du marqueur CD27 (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 7; TNFRSF7), initialement décrit comme délivrant un co-signal prolifératif aux lymphocytes T l'exprimant (71). Ce marqueur est aussi une caractéristique des cellules B mémoires, qu'elles proviennent des organes lymphoïdes secondaires ou qu'elles soient recirculantes (72, 73). Il a ainsi pu être confirmé/redémontré que les lymphocytes B mémoires post-centres germinatifs exprimant une Ig commutée ou une IgM sans l'IgD présentent des gènes d'Ig avec mutations somatiques des régions variables. Ces études immunophénotypiques ont surtout permis de mettre en évidence un nouveau compartiment cellulaire jusqu'alors ignoré, les lymphocytes B mémoires IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺. A nouveau, le groupe de CA Reynaud et JC Weill a apporté des contributions majeures à la compréhension de ce compartiment. Chez l'homme, les cellules B IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ sont les cellules B de la réponse aux polysaccharides, localisées dans la zone marginale de la rate (74). Elles dériveraient d'un lymphocyte B transitionnel ayant reçu un signal Notch2 (cf ci-dessus). D'après le groupe de CA Reynaud et JC Weill, ces cellules recirculent continûment, mûrissent en dehors du centre germinatif et présentent un répertoire de gènes d'immunoglobuline dit prédiversifié (75). Le groupe de CA Reynaud et JC Weill a en effet montré que les régions variables des gènes des Ig de ces cellules sont mutées en absence de stimulation antigénique. L'expression d'AID a été retrouvée à faible taux dans ces cellules chez les jeunes enfants (75, 76). Les régions variables

des gènes des Ig de ces cellules présentent des taux de mutation somatiques en moyenne deux fois plus faible que les cellules B post-centres germinatifs. Le groupe de Küpper a caractérisé ces cellules au plan moléculaire et a décrit l'existence de mutations de *Bcl6*, interprétées par ces auteurs comme une preuve de passage dans le centre germinatif (77). Les études de répertoire par séquence haut débit sur cellules purifiées suggèrent que les populations B mémoires avec Ig commutées ont un répertoire *IGHV* différent des cellules B mémoires CD27+IgM+IgD+, démontrant une histoire d'exposition à l'antigène différente pour ces deux sous-populations B mémoires (78).

Récemment deux nouvelles populations B mémoires ont été décrites, elles présentent la caractéristique majeure d'être CD27-. La première population correspond à des cellules mémoires CD27- IgD-, IgG+ ou IgA+ représentant 1 à 4% des cellules circulantes et 25% des cellules IgG+ circulantes. Ces cellules ont une morphologie et un immunophénotype similaires aux cellules CD27+, IgG+ mais un taux de mutations somatiques inférieur (79). Puisqu'elles ont subi la commutation isotypique, elles ont probablement une origine post-centre germinatif. La deuxième population a été mise en évidence tout récemment (80). Il s'agit de cellules B CD27- IgM+ IGD- qui partagent les caractéristiques des cellules CD27+, IgM^{high} IgD^{low}. Cette population possède notamment un biais d'utilisation des gènes *IGHV1* et *IGHV3-23* tout comme la population IgM+ CD27+ (78). L'origine de ces cellules serait identique à leur contrepartie CD27 positive et pourrait être le compartiment de la zone marginale.

4.2.5 Les cellules B sanguines et leur répertoire IGHV

Dans le sang, les cellules B transitionnelles comptent à peu près pour 3% des lymphocytes B totaux (78). Les cellules B naïves, négatives pour le CD27, représentent environ 70% des cellules B totales et sont IGM+faible IgD+Fort. Les autres cellules, exprimant le CD27, comptent pour un peu moins de 30% de la population B totale. Ces dernières sont divisées en 3 sous-populations, en fonction de l'isotype de leur immunoglobuline : les cellules IgM^{seule}, les cellules IgM+ IgD+ et les cellules IgM-IgD- (73, 74). Les cellules CD27+ IgM^{seule} constituent un petit contingent de cellules proche de 1% qui peut augmenter chez le jeune enfant. Les deux sous-populations CD27+ IgM+ IgD+ et CD27+ IgM-IgD- sont en proportions égales aux alentours de 15% des cellules B circulantes. Comme indiqué ci-dessus, les cellules CD27+ IgM+ IgD+ correspondent aux cellules B mémoires issues de la réponse T indépendante contre les antigènes

polysaccharidiques, glycolipidiques et les acides nucléiques, constituant une première ligne de défense de type innée contre certains micro-organismes comme les bactéries encapsulées (streptocoques, pneumocoques). Ces cellules constituent en fait le pool circulant des cellules B CD27+ IgM+ IgD+ de la zone marginale splénique (75). Les cellules CD27+ IgM-IgD- ont subi la commutation de classe. Elles expriment une IgG ou IgA. Elles sont post-centre germinatif, ayant subi le processus d'hypermutation somatique et possédant séquences *IGHV* mutées dans leur région variable. Elles correspondent aux cellules B mémoires à réponse T dépendante.

Une des toutes premières publications décrivant le répertoire *IGHV* des lymphocytes B humain date de 1997 (81). Depuis, une petite centaine de publications ont été produites sur le sujet. Cependant, la plupart de ces publications ont pour objet de comparer un répertoire pathologique (lymphomes ou maladies auto-immunes) à un répertoire normal. De fait, la plupart de ces publications étudient le répertoire lymphocytaire B sanguin, toutes sous-populations confondues. A notre connaissance, seulement deux groupes ont étudié le répertoire *IGHV* dans les populations sanguines B triées, celui de Crowe en 2007 et celui de Dunn Walter en 2010 (78, 82). Pour ces deux groupes, les sous-populations lymphocytaires B sanguines triées étaient les cellules B naïves, les cellules mémoires commutées pour l'Ig et les cellules B mémoires CD27+IgM+IgD+. Le groupe de Dunn Walters a aussi étudié les cellules B transitionnelles. Le groupe de Crowe a utilisé une technique classique consistant à cloner les produits PCR issus de la rétrotranscription des ARN des gènes *IGHV* et à les séquencer. Pour travailler au niveau unicellulaire, ce groupe a utilisé une technique d'expansion unicellulaire (donc clonale) sur cellule nourricière. Le groupe de Dunn Walters a également travaillé à partir des ARN, mais a utilisé les techniques de séquençage de nouvelle génération à haut débit, chaque séquence d'immunoglobuline étant reconstruite bio-informatiquement. Les résultats de ces deux groupes sont très convergents. Ils montrent que les répertoires des cellules B transitionnelles et naïves sont très proches. Il existe cependant quelques différences. Les gènes *IGHV1* est retrouvé plus fréquemment dans les cellules B naïves que les cellules B transitionnelles. Toujours par rapport aux transitionnelles, la fréquence de gènes *IGHV3-23* et *IGHJ4* est augmentée. Lorsque la comparaison porte sur les cellules B mémoires CD27+ totales et les cellules B naïves, la fréquence d'utilisation du segment *IGHJ4* augmente alors que celle du segment JH6 diminue. Les gènes *IGHV3* sont plus fréquemment remaniés dans les lymphocytes B CD27+IgM+IgD+ comparé aux cellules B naïves, avec une

prédominance *IGHV3-23* et *IGHV3-66*. Cette augmentation de fréquence est liée au réarrangement JH4 (gènes *IGHV3*, *IGHJ4* conjoints). Les cellules B mémoires CD27+IgM- (cellules B avec Ig commutée) ont une augmentation de fréquence des remaniements des gènes *IGHV1* ceci en conjonction avec le remaniement JH4, et une sur-représentation de *IGHV1-18*, *IGHV1-2*, *IGHV1-46* et *IGHV1-69*. D'une façon globale, les cellules B mémoires circulantes ont des CDR3 plus courts que les cellules B naïves.

Les deux populations B mémoires CD27-, récemment décrites, sont présentes dans le sang circulant et représentaient à elles deux environ 5% de la population B circulante.

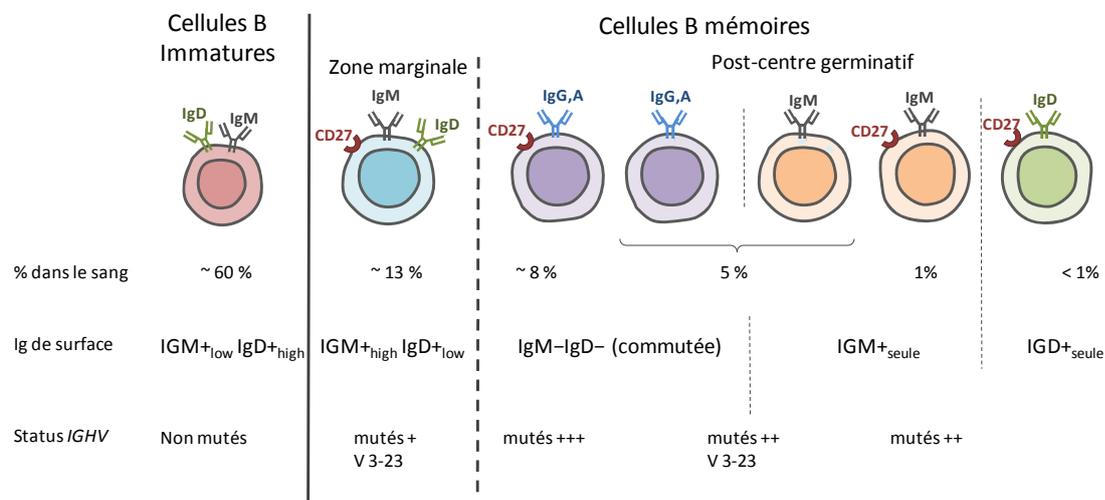


Figure 33 : représentation schématique des différentes populations mémoires B circulantes

Source : (74, 78, 80)

4.2.6 Les cellules de la zone marginale

Ce cours paragraphe est pour rappeler qu'au travers de cet exposé, le compartiment Zone Marginale a été évoqué pour les cellules transitionnelles qui y reçoivent un signal de survie, les lymphocytes B naïfs folliculaires qui y sont activées, les cellules B mémoires post-centre germinatifs qui s'y nichent, et les cellules B de la réponse T-indépendante dont il est le réservoir, et les cellules B mémoires IgM+ CD27-. Ce compartiment est donc de composition particulièrement complexe puisque s'y ajoutent les cellules dendritiques et les macrophages qui jouent un rôle de co-signal et de transporteur d'antigène.

***Chapitre 2 : Relation entre altérations
des gènes des immunoglobulines et
lymphomagénèse B***

Accident de recombinaison des gènes des immunoglobulines, dérégulation et mutations d'oncogènes et lymphomes B périphériques.

Les translocations chromosomiques sont les remaniements récurrents les plus courants dans les lymphomes B. Elles sont définies comme un échange de matériel génétique entre deux chromosomes non homologues (83). La plupart des translocations impliquées dans les cancers lymphoïdes B post-médullaires sont réciproques. Elles sont souvent associées à un type morphologique, clinique et un profil d'expression génique distincts (84). Dans ce chapitre, nous ne traiterons que des remaniements des gènes des Ig avec des partenaires oncogéniques (figure 34). La table en annexe 1 répertorie les lymphomes B pour lesquels il existe un nombre significatif de remaniements impliquant les gènes des immunoglobulines (>5%).

Les réarrangements accidentels des gènes des immunoglobulines avec un oncogène sont la contrepartie de la mécanique de réarrangement des gènes des Ig, que ce soit le réarrangement VDJ au stade médullaire ou lors de la commutation de classe dans le centre germinatif.

D'une façon générale, ces réarrangements accidentels nécessitent 3 étapes :

1. la formation de cassures double-brin sur des chromosomes distincts.

Les cassures sont normales sur les loci des immunoglobulines car parties prenantes des processus de réarrangement V(D)J, d'hypermutation somatique ou de commutation de classe. De plus, la formation de boucles d'ADN durant la transcription stérile lors du réarrangement VDJ ou de la commutation de classe est hautement corrélée aux mutations et aux recombinaisons de l'ADN ; en effet, l'ADN simple brin est beaucoup plus vulnérable que l'ADN double brin et est plus sensible aux désaminations spontanées ou induites. Il notamment est 100 fois plus susceptible de subir une déamination spontanée que l'ADN double brin (85).

Les cassures sur les chromosomes partenaires peuvent être favorisées par l'existence de sites fragiles sur les chromosomes, cibles potentielles pour la formation de translocations. Ces cassures sont induites par des facteurs externes bien connus comme les radiations ionisantes ou les chimiothérapies (86).

Les cassures sur le chromosome partenaire sont aussi induites par des facteurs intrinsèques comme le métabolisme oxydatif, ou le stress réplicatif. Ce dernier survient lors d'une réplication inefficace bloquant le système (87). Un des mécanismes provoquant ces cassures pourrait être la collision entre le système réplicatif (fourchette de réplication) et le système transcriptionnel. Cette collision entraîne un effondrement de la machinerie réplication ce qui génère ces cassures double-brin (88). Les interactions entre les complexes de RNA polymérase et la fourchette de réplication entraînent une augmentation importante du taux de recombinaison (89).

2. la proximité même transitoire des extrémités de cassure.

L'environnement chromosomique peut influencer la fréquence de cassures double-brin à proximité des oncogènes. Par exemple, *c-myc* et *N-myc* sont deux oncogènes appartenant à la même famille, l'un est exprimé dans le lignage lymphocytaire, l'autre les cellules neuronales. L'oncogène cellulaire *c-myc* est le partenaire des gènes des Ig des translocations dans le lymphome de Burkitt tandis que *N-myc* est l'objet d'amplification dans le neuroblastome chez l'homme. Cependant, chez la souris déficiente en DNA-Ligase 4 du NHEJ et en p53 (modèle murin avec une haute fréquence de lymphomes proB avec translocation de *c-myc*), l'insertion de *N-myc* en lieu et place de *c-myc* conduit à l'apparition de tumeurs pour lesquelles *N-myc* devient le partenaire des translocations avec les gènes des Ig (90).

De nombreuses études ont montré que des sites proches ont davantage de chance d'avoir un événement de recombinaison (91). Des études récentes ont montré que les gènes ou les chromosomes ne sont pas localisés au hasard dans le noyau (92). A cet égard, les auteurs du domaine ne tranchent entre le modèle dit « d'abord contact » (contact first) et le modèle « d'abord cassure » (breakage first). Le premier modèle suppose que cette proximité des régions impliquées des deux chromosomes partenaires précède la cassure. Le deuxième modèle implique que les brins cassés sont initialement distants puis se rapprochent secondairement l'un de l'autre selon un mécanisme non élucidé (93). A nouveau l'exemple de *c-Myc* est intéressant. Les loci *C-MYC* et *IGH* sont fréquemment colocalisés dans les cellules B, mais pas dans les autres types de cellules. Cette colocalisation précède l'action d'AID. Ces données favorisent donc le modèle « contact d'abord » dans la cellule B.

3. la ligation en trans de ses extrémités.

La ligation implique deux grandes voies, la voie de NHEJ et celle des HR (Homologous recombinaison). Il existe des modèles qui montrent que la fréquence des mésappariements est augmentée lorsqu'il existe une mutation entraînant une perte fonctionnelle sur un des acteurs des systèmes en jeu. Par exemple la perte de Nbs1, γ -H2AX, ATM, or 53BP conduit à la formation de haut niveau d'aberrations chromosomiques, impliquant le récepteur à l'antigène (94). De même chez les patients présentant ce même type de mutations, le taux de cancers est augmenté. Dans les syndromes de Fanconi, la survenue de translocations et de d'hémopathies malignes est importante (89). Dans l'ataxie télangiectasie présentant un déficit fonctionnel d'ATM, le risque leucémogénèse est augmenté avec une fréquence de lymphomes supérieure à la population normale (93).

Les partenaires décrits pour le locus IGH sont présentés dans la figure ci-dessous

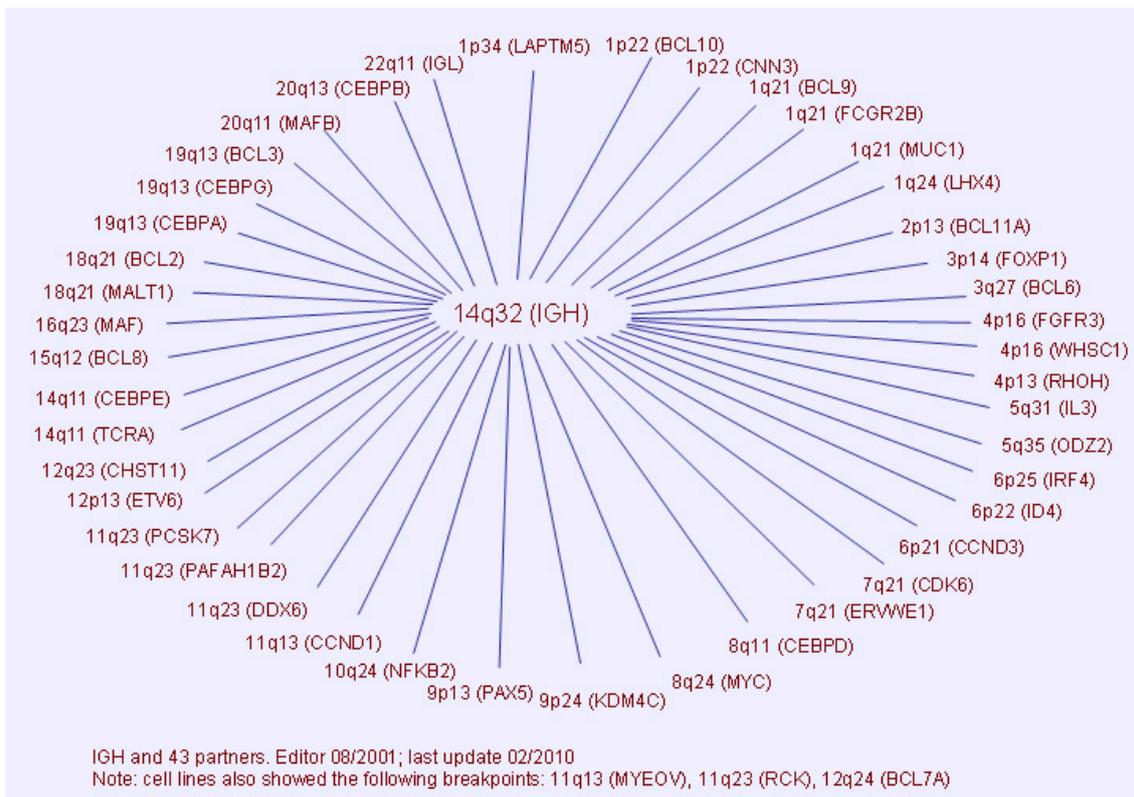


Figure 34 : les partenaires d'IGH impliqués dans des remaniements chromosomiques

Source : d'après Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (95)

En règle, la conséquence de ces translocations est que l'oncogène remanié est sous le contrôle des éléments régulateurs des gènes des immunoglobulines.

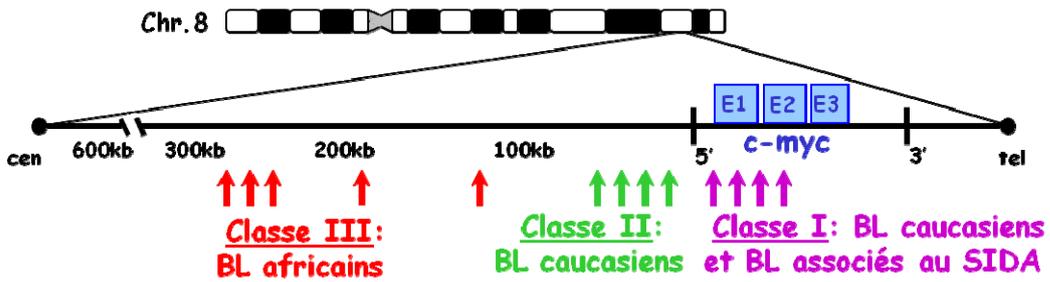
De tel réarrangements peuvent se produire dans la moelle osseuse lors d'un remaniement VDJ manqué et exprimer leur pouvoir lymphomatogène à des stades post-médullaires ultérieurs, comme pour les lymphomes folliculaires (t(14 ;18)(q32 ;q21)) avec surexpression de la protéine antiapoptotique Bcl2 et les lymphomes du manteau (t(11 ;14)(q13 ;q32)) avec dérégulation de l'expression de la cycline D1 (96, 97). Pour ces deux lymphomes, il a été retrouvé des sites RSS cryptiques imparfaits dans les loci des oncogènes correspondants (98). Ces réarrangements impliquant une hybridation entre les sites RSS du gène *IGH* et les sites RSS imparfaits des oncogènes en cause sont associés à un rognage des nucléotides jonctionnels et à l'addition de N-nucléotides ainsi que de T-nucléotides (template nucleotides signifiant : copies d'au moins 5 nucléotides des séquences flanquantes adjacentes au point de cassure) (97). Les lymphomes du MALT avec la translocation t(14 ;18)(q32 ;q21) impliquant le remaniement du gène *MALT1* avec le locus *IGH* relèvent aussi d'un réarrangement VDJ médullaire manqué avec insertion de T-nucléotides en zone jonctionnelle (99). Dans ce cas, il est intéressant de noter que le locus *MALT1* a un site pseudo-RSS imparfait.

L'exemple du lymphome de Burkitt (BL) est intéressant car il relève soit d'un réarrangement VDJ manqué dans la moelle osseuse, soit d'une commutation de classe ratée dans le centre germinatif. Comme déjà cité, ce lymphome est directement en rapport avec le réarrangement de l'oncogène *c-myc*. Trois présentations cliniques du BL sont décrites, les BL sporadiques ou caucasiens, les BL endémiques ou africains et les BL du sujet infecté par le VIH. Les sites de cassure sur le locus *IGH* et *c-Myc* sont un peu différents pour ces trois types de présentation clinique de la même maladie et sont présentés dans la figure 35.

Le résultat de ces remaniements est que *c-myc* peut être sous contrôle de la LCR3'IGH seulement (classes I et II de réarrangement) ou sous contrôle de E μ . L'intérêt cette analyse est de montrer que certains de ces réarrangements relèvent de la mécanique de commutation de classe (classe I et II) alors que d'autres relèvent de la mécanique de réarrangement VDJ, lesquels seraient produits lors de la différenciation des progéniteurs B dans la moelle osseuse, mais s'exprimeraient plus tardivement au stade centroblaste, en rapport avec des événements géniques additionnels comme la perte de *TP53*, les mutations du gène codant pour la cycline D3 ou codant pour le facteur TCF3 (100).

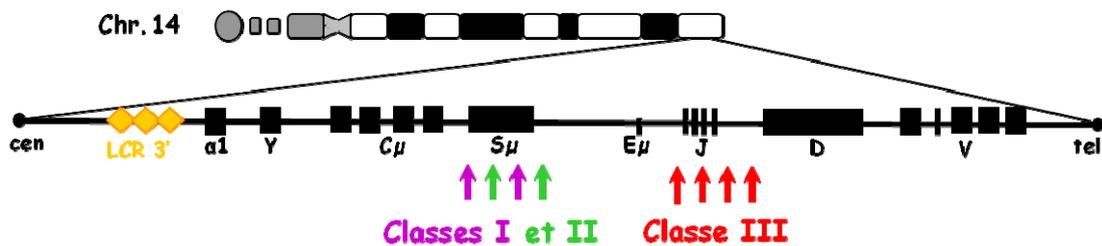
Points de cassure dans la région 8q24.

Locus c-myc



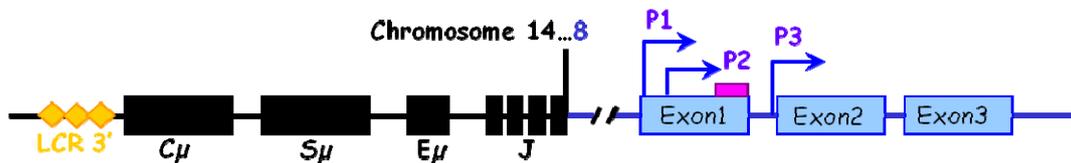
Points de cassure dans la région 14q32.

Locus IgH



➤ **Réarrangements et dérégulations de c-myc**

✓ **Classe III**



D'après Blum et al, 2004.

✓ **Classes I et II**

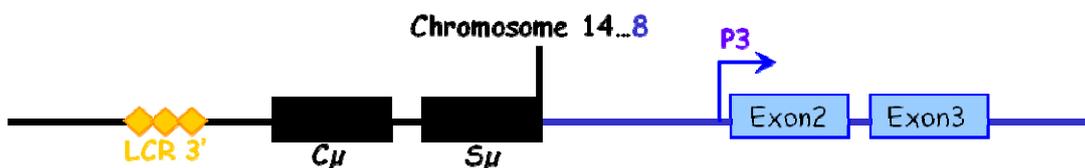


Figure 35 : les réarrangements impliquant C-MYC et IGH dans le lymphome de Burkitt

Source : adaptée de Blum, 2004 par S. Panteix, mémoire de DEA Université de Limoges, 2005

En sus d'être responsable d'accident de commutation isotypiques manquées, AID est à l'origine de mutations d'oncogènes comme *c-Myc*, *Bcl6*, *Pim1* ou *PAX5* (101). Récemment il a été montré chez la souris que 25% de tous les gènes exprimés par les lymphocytes B du centre germinatif sont mutés par AID, la plupart d'entre eux à une fréquence 100 fois plus élevée que pour les Ig (figure 36). *c-myc* présente une fréquence de mutation proche de la fréquence normale mais accumule les mutations par défaut de la voie MMR (102).

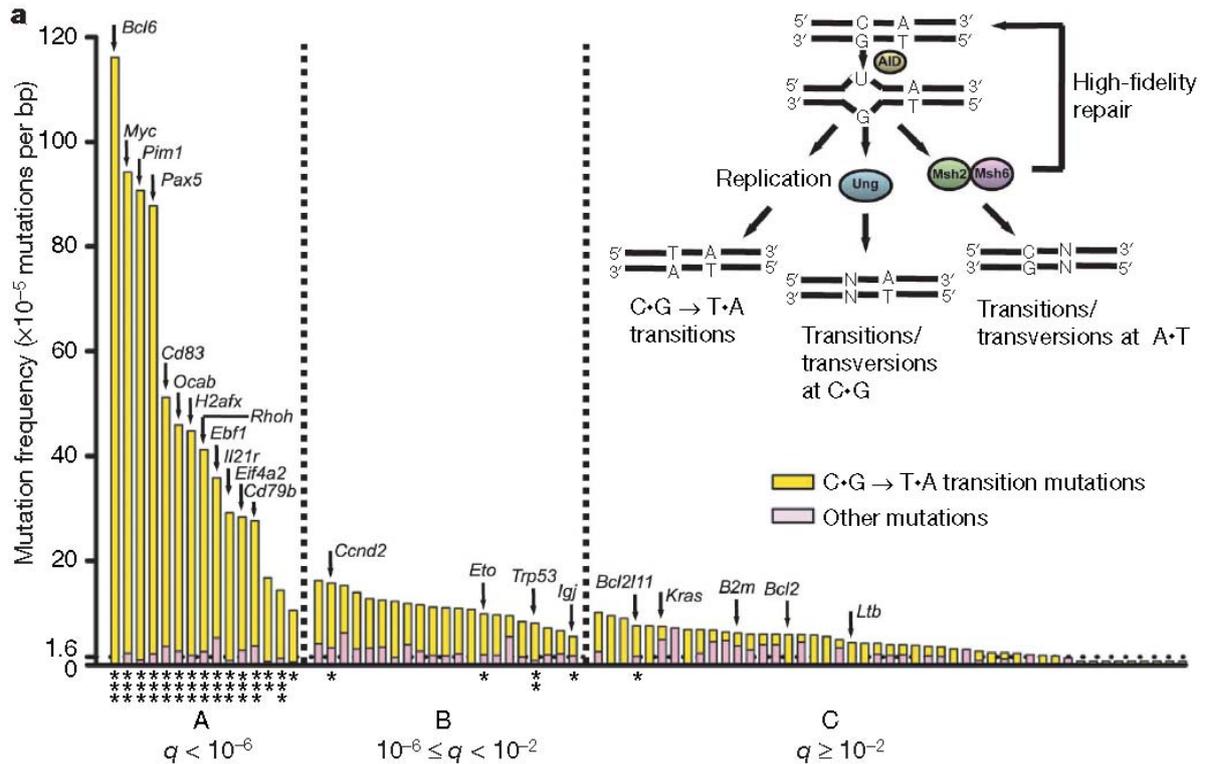


Figure 36 : fréquences de mutations de AID sur ces gènes cibles chez la souris présentant un double Knockout MSH2^{-/-} et UNG^{-/-}

Les étoiles donnent la signification statistique de la richesse en points chauds : une étoile : $q < 0.05$; deux étoiles : $q < 0.01$; trois étoiles : $q < 0.001$.

Source : (102)

Le rôle d'AID dans la lymphomagenèse a pu être évalué chez la souris. L'expression ubiquitaire d'AID chez la souris est responsable de plusieurs types de tumeurs (le plus souvent dans les cellules T), en association avec des mutations sur de nombreux gènes tels que *C-MYC*, *TP53* et *PIMI*. A l'inverse, la délétion homozygote du gène codant pour AID a pour effet de bloquer toute translocation de MYC sur le locus IGH. Ces souris AID^{-/-} ne font plus aucun lymphome dérivé d'un lymphocyte B du CG ou post CG (103).

Le Répertoire *IGHV* dans les lymphomes

L'analyse du répertoire *IGHV* dans les lymphomes a permis des avancées importantes dans la compréhension de leur physiopathologie et de la relation à la stimulation antigénique. La présence d'un biais dans le répertoire des gènes des Ig est souvent considérée comme la preuve d'une sélection du progéniteur tumoral par l'antigène. Cependant, la situation peut être plus subtile, comme pour les lymphomes folliculaires. Dans ces lymphomes, il a été montré que l'immunoglobuline est sélectionnée par son microenvironnement pour l'existence de sites de glycosylation, ce qui induit un biais de répertoire pour le réarrangement du gène *IGHV4-34* indépendamment de la stimulation antigénique (104). Nous verrons qu'une telle activation du BCR indépendante de l'antigène est aussi possible dans la LLC.

Dans le cas de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC), le statut mutationnel de l'immunoglobuline tumorale permet aussi de donner une information sur le pronostic de la maladie. C'est aussi pour la LLC que la preuve la plus remarquable de l'importance de l'activation continue du BCR a été apportée avec la description BCR stéréotypés.

1. L'exemple de la LLC

Les premières études du répertoire ont commencé dans les années 90. Mais c'est le groupe de Chiorazzi qui, en étudiant une série importante (83 cas), a montré que le répertoire *IGHV* dans la LLC est biaisé et différent de la population B circulante normale (105) : certains gènes *IGHV* sont surreprésentés comme l'*IGHV1-69*, *IGHV4-34* et l'*IGHV3-7* tandis que d'autres sont peu représentés comme l'*IGHV3-72*, l'*IGHV3-15* ou l'*IGHV1-8*. Ces données ont été validées et précisées par de nombreuses études (figure 37). Ainsi nous avons aujourd'hui un panorama fiable du répertoire de la LLC, qui finalement est peu différent de celui rapporté dans les publications initiales (figure 37) (106).

Il existe aussi une restriction sur les gènes *IGHD*. Dans plus de la moitié des cas de la série de Chiorazzi, seuls 5 *IGHD*, avec surtout *IGHD3-3*, étaient retrouvés réarrangés. Le répertoire des gènes *IGHJ* est caractérisé par une prédominance d'*IGHJ4* et *IHGJ6*. Egalement certaines associations de segments géniques sont remarquées comme l'*IGHV1-69* avec l'*IGHD3-3* et l'*IGHJ6*. Ces caractéristiques de répertoire de la LLC sont considérées

comme la preuve de l'implication d'une stimulation antigène dans le développement de la maladie.

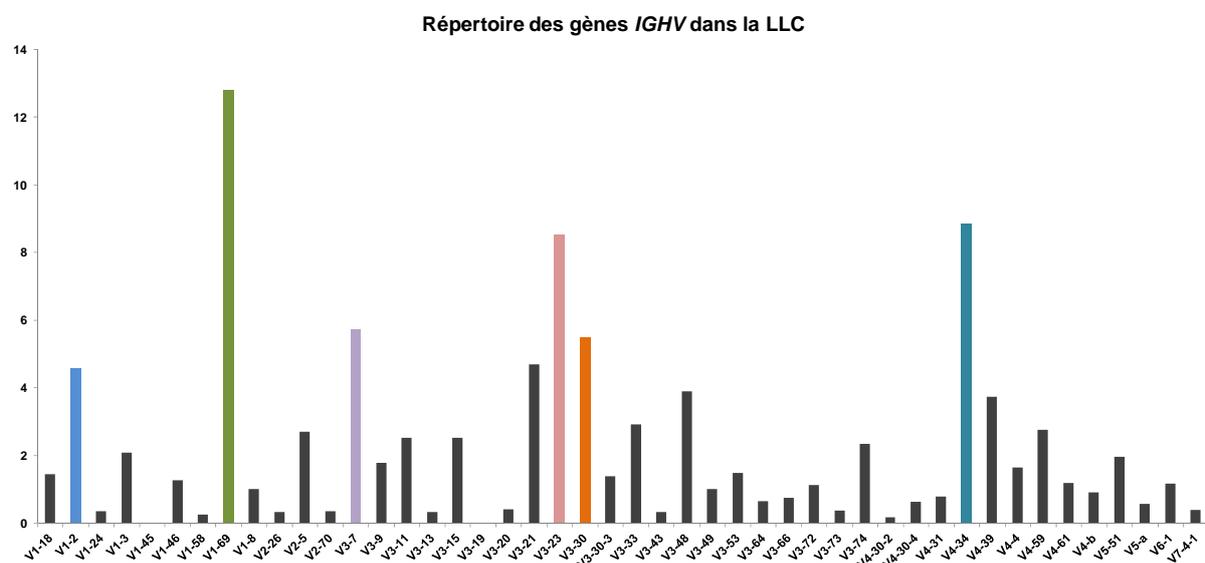


Figure 37 : représentation du répertoire *IGHV* de la LLC en 2012

Source : (106) extrait d'une table supplémentaire de la publication.

En 1999, deux groupes, celui de Chiorazzi et celui de Hamblin et Stevenson, montrent, de façon indépendante, que le statut mutationnel de l'*IGHV* prédit la survie des patients (107, 108) : la population non mutée (avec une homologie > 98% de la séquence *IGHV* déduite de celle du primer par rapport à la séquence germinale, la partie V du CDR3 comprise) ont une survie plus courte, associée à une progression de la maladie plus rapide, un profil cytogénétique anormal, une évolution clonale au caryotype et une résistance à la chimiothérapie. Ces données sont devenues maintenant admises par toute la communauté scientifique du domaine. L'évaluation du statut mutationnel fait aujourd'hui partie des critères pronostiques de la maladie et a fait l'objet de standardisation pour la technique et le calcul par le groupe ERIC (European Research Initiative on CLL) (109, 110). Pour ce groupe, il est préférable d'utiliser la variable % d'homologie de séquence entre l'*IGHV* muté et sa contrepartie germinale plutôt que de taux de mutations. La raison en est qu'il est parfois difficile et incertain de reconstruire a posteriori le scénario du processus de mutation par AID, comme lors d'évènements de type mutations répétées ou lors de courtes insertions ou délétions.

La question du seuil d'homologie de séquence, initialement proposé à 98%, a été débattue dès 1999. Finalement le choix de 98%, qui avait été proposé au départ pour exclure les polymorphismes potentiels, a été retenu car il a une relevance biologique et clinique.

Autrement dit, ce seuil de 98% d'homologie semble être le meilleur pour séparer les patients de bon et de mauvais pronostic, que ce soit en terme d'évolution de la maladie ou en terme d'association à d'autres facteurs de mauvais pronostic comme l'inactivation de p53 ou l'expression de la tyrosine kinase ZAP70. Ainsi le statut dit non muté est un abus de langage car, parmi les cas non mutés, certaines séquences sont mutées faiblement et non strictement homologues à la séquence germinale.

Dès 2003, des motifs stéréotypés, autrement dit retrouvés chez des patients différents de zones géographiques différentes, sont mis en évidence dans les CDR3: parmi les cas utilisant un *IGHV3-21*, la moitié présente des HCDR3, homologues, courts car dépourvu d'*IGHD* associés à une chaîne légère utilisant un *IGLV3-21*, également canonique (111). Les HCDR3 aboutissent au motif consensuel DANGMDV en amino-acides et le LCDR3 donne le motif QVWDS(S/G)SDHPWV. Ceci est la preuve évidente qu'il existe un antigène commun jouant sans doute un rôle dans la pathologie. Les cas avec motif stéréotypés présentent aussi une évolution clinique homogène contrairement aux cas utilisant les *IGHV3-21* ne présentant pas de motifs stéréotypés (112).

Cas utilisant les motifs stéréotypés IGHV 3-21 et IGLV3-21			
V _H	CDR3	V _L	CDR3
V _H 3-21	CARDANGMDV	V _λ 2-14	YYCQVWSSSDHPWV
V _H 3-21	V _λ 2-14
V _H 3-21	V _λ 2-14G.....
V _H 3-21	V _λ 2-14Q.....
V _H 3-21	V _λ 2-14G.....
V _H 3-21	V _λ 2-14*
V _H 3-21	V _λ 2-14G.....
V _H 3-21	V _λ 2-14G.....
V _H 3-21	V _λ 2-14*
V _H 3-21	V _λ 2-14G..Q...
V _H 3-21	.V.....	V _λ 2-14
V _H 3-21	V _λ 2-14G.....
V _H 3-21	V _λ 2-14G.....
V _H 3-21	V _λ 2-14
V _H 3-21	...R.....	V _λ 2-14
V _H 3-21	..T.R.....	V _λ 2-14GT.....
V _H 3-21R.....	V _λ 2-14L.....
V _H 3-21	..T.R.....	V _λ 2-14
V _H 3-21	..T.R.....	V _λ 2-14
V _H 3-21	.SG.R.....	V _λ 2-14
Cas utilisant des IGHV 3-21 non stéréotypés			
Fra4	ARDRTYFPDAYFDF	IGKV3D-15	QQYNVWPPGR
Gre3	AKDYDSSGANFQH	IGLV1-51	GTWDTLSLAWL
Ita2	ARGVGNDRYFFDF	IGKV1-12	QQANSFPYS
Gre5	ARIWDIVVVPDAMIWA	IGKV1-27	QKYNDAQFT
Gre4	ARDRRSIVVVVAATPVY	IGKV4-1	QQSYSTLVEA
Fra2	ATSGKDTTMVQGGHFDY	V2-14 (IGLV3-21)	QVWSSSDHPFV
Gre7	ASQLWFDRVNNYYMDV	IGKV1-33/1D-33	QQYDNLPRYT
Gre2	AREPLSVLLWFGESFGGFDY	V2-14 (IGLV3-21)	QVWDSGSDHPWV
Gre6	ARDRLLYGYSSTSCWDYYYYGMDV	IGKV1-17	LQHNSYPWYT

Figure 38 : exemples de CDR3 issus des *IGHV3-21* de cas de LLC.

A gauche sont représentés les HCDR3, à droite ceux des chaînes légères. Le panneau du haut présente des cas portant des motifs stéréotypés. Le panneau du bas présente des cas présentant un *IGHV3-21* non stéréotypés. Dans ce cas, le CDR3 de la chaîne légère est variable en type, gène et séquence.

Chaque ligne représente les séquences CDR3 de la chaîne lourde (à gauche) ou de la chaîne légère (à droite). Les séquences des HCDR3 présentent une grande similarité et il existe la même similarité du côté des LCDR3. Source : extrait de deux publications (113) (112).

Aujourd'hui, il est dit que près de 27% des cas de LLC présentent un motif stéréotypé (114). Les motifs sont présents le plus souvent sur des séquences non mutées mais existent aussi sur des séquences mutées. Ces motifs sont maintenant regroupés en sous-groupes, selon des critères bien définis maintenant ; ils doivent présenter une homologie de HCDR3 > à 60% en acides nucléiques avec la notion de motif conservé (115). Ce motif peut par exemple comporter des changements de gènes notamment des *IGHV*. C'est le cas du sous-groupe N°1 qui est défini par l'utilisation d'un *IGHD6-19* et d'un *IGHJ4* mais qui comportent plusieurs *IGHV* (*IGHV1-2*, *IGHV1-3*, *IGHV1-8*, *IGHV1-18*, *IGHV1-5-51*, *IGHV5- α* , *IGHV5-5 1* ou *IGHV7-4-1*). Lorsqu'il existe plusieurs *IGHV* dans le même sous-groupe, ces gènes se sont pas complètement éloignés en terme de séquence car ils appartiennent en général aussi au même clan phylogénique (116). Il existe plus de 110 sous-groupes différents. Leur taille varie d'un grand nombre de cas (représentant jusqu'à 2,5% des cohortes) à deux cas par sous-groupe (114, 117). Certains sont plus souvent impliqués dans les motifs canoniques, comme l'*IGHV1-2*, *IGHV1-69* ou l'*IGHV3-21*, tandis que d'autres sont peu impliqués, comme l'*IGHV3-7* ou l'*IGHV3-74*. Le répertoire utilisé dans ces motifs stéréotypés est divisé en deux grands groupes en terme de fréquence, ceux qui sont majeurs comportant un nombre conséquent de cas, ceux mineurs qui intéressent peu de patients (106). Les groupes majeurs n'utilisent que 6 gènes *IGHV* (*IGHV1-69*, *IGHV1-3*, *IGHV1-2*, *IGHV3-21*, *IGHV4-34*, et *IGHV4-39*).

Il existe certaines exceptions à la règle du seuil de 98% d'homologie de séquence. Par exemple, le groupe de Rosenquist a le premier montré que l'utilisation de l'*IGHV3-21* représente plutôt un mauvais pronostic malgré un statut plutôt muté (118). En réalité, il a été montré plus tard que c'est l'existence du motif stéréotype ARDANA/GMDV associé au réarrangement de l'*IGHV3-21* qui est le marqueur de mauvais pronostic (113).

L'implication du BCR dans la LLC est autant suggérée par l'expression de la tyrosine kinase ZAP70 dans les LLC « non mutées » que par l'existence des motifs stéréotypés et l'existence de cas de « LLC mutées » supposées post-centre germinatif. La très vaste littérature dans le domaine plaide en faveur d'une stimulation antigénique continue, au moins pour les cas avec motif stéréotypé ou *IGHV* muté. Certains sous-types *IGHV* sont associés à certains virus comme *IGHV1-69* avec le CMV, et *IGHV4-34* avec le CMV et l'EBV. De très nombreuses spécificités antigéniques contre les antigènes du soi ont été rapportées comme MYHIIA (un antigène exposé à la membrane des cellules apoptotiques). Citons également les

anciens papiers rapportant des spécificités dirigées contre les ADN double et simple brin, les histones, les antigènes cardiolipidiques, les composants du cytosquelette (119).

Cette notion de stimulation continue de la cellule B de LLC par des auto-antigènes via le BCR a récemment été remise en question. Marcus Dühren-von Minden et col. ont montré dans un très joli travail que les cellules de LLC sont sujettes à une stimulation autonome du BCR et indépendante de l'antigène. Ces auteurs démontrent que l'Ig de surface de la LLC a pour propriété intrinsèque de s'auto-agrégation. Cette auto-agrégation implique le CDR3 de l'IGHV et un épitope interne de l'Ig situé en dehors de la région variable, donné par la séquence VNWPLPPVRQFS, retrouvée sur toutes les Ig testées par ces auteurs. Cette propriété des Ig de LLC serait indépendante du statut mutationnel (120).

2. L'exemple du LNH du manteau

Comme dans la LLC, il existe aussi un biais de répertoire dans le lymphome du manteau. On retrouve une surreprésentation des *IGHV3-21*, *IGHV4-34*, *IGHV1-18* et *IGHV3-23* (figure 39). Le réarrangement de ces gènes est retrouvé dans 46,3% de la dernière cohorte publiée, comportant 807 cas (121). Il existe aussi des motifs stéréotypés dans les HCDR3, distincts de ceux impliqués dans la LLC. Ils sont actuellement répartis en 38 clusters et représentent 10,4% des cas de cette cohorte. Deux gènes sont souvent impliqués dans ces motifs : *IGHV3-21* et *IGHV4-34*. Ces données apportent une preuve indirecte de l'implication d'antigènes ou de superantigènes dans le développement de la maladie. En cohérence avec leur origine cellulaire supposée naïve, il existe près de 30% de cas strictement non mutés. Si l'on adopte le seuil de 98% d'homologie, 77% des cas sont non mutés. Le répertoire des gènes variables est différent dans les sous-groupes très mutés (<97% d'homologie), non mutés strict (100% d'homologie) et peu muté (entre 97% et 99,9% d'homologie) : l'*IGHV3-21* est présent plutôt dans le groupe non muté strict (22,7%) alors qu'il l'est peu dans le groupe très muté (4,4%). Au contraire, l'*IGHV3-23* est présent dans le groupe muté (20,2%) alors qu'il n'est pas fréquent dans le groupe non muté (4,2% des *IGHV3-23*). Il existe des changements récurrents en acides aminés pour certains *IGHV* comme l'*IGHV3-21*, *IGHV1-8*, *IGHV3-23*. La présence de mutations conservées entre les patients suggère une sélection antigénique clonale des progéniteurs tumoraux.

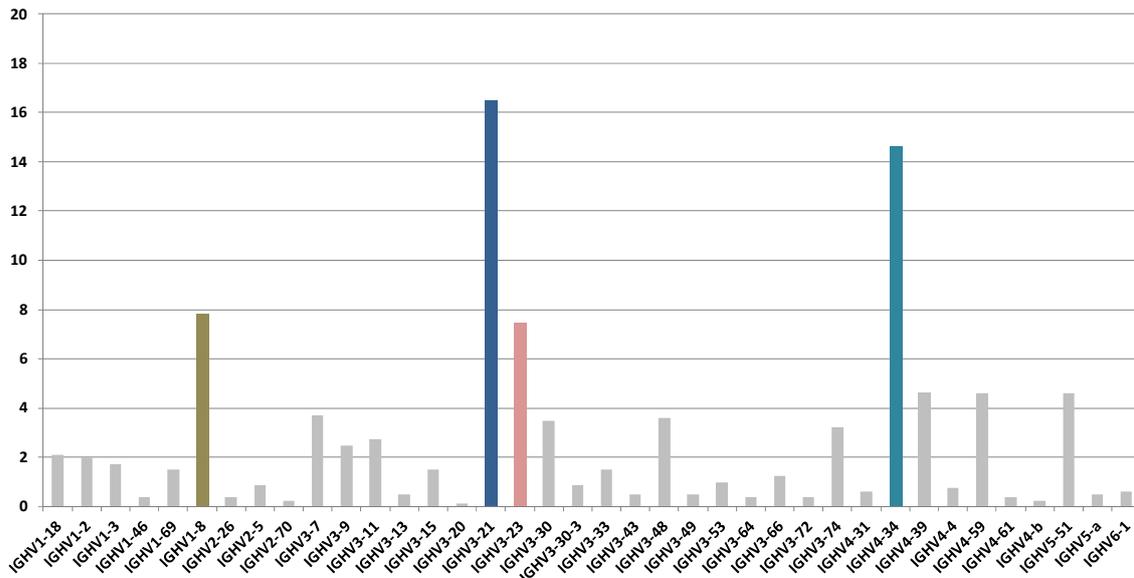


Figure 39 : représentation du répertoire IGHV dans le lymphome du manteau

Les barres représentent le pourcentage de cas retrouvés dans la cohorte.
Source : extrait d'une table supplémentaire de la publication (121)

3. L'exemple des lymphomes du MALT

L'état des connaissances du répertoire *IGHV* pour les lymphomes du MALT est assez disparate et parfois contradictoire dans la littérature. Finalement, peu de publications sont dévolues à ce sujet. Une requête sur PubMed avec comme mot clé « MALT lymphoma » retrouve plus de 2000 publications. Si l'on ajoute le mot clé « IGHV » ou « immunoglobuline gene rearrangement », le nombre de publication tombe à moins de 30, avec une très forte contamination par des publications sur les lymphomes non MALT de la zone marginale.

En réalité, deux phénomènes prédominent dans ces lymphomes, la localisation d'organe et l'infection bactérienne associée, et les translocations chromosomiques équilibrées impliquant l'activation de NF-kappa B. Par exemple, les lymphomes du MALT gastriques sont associés à *Helicobacter pylori*, alors que ceux des annexes oculaires sont associés à *Chlamydia psittaci* et ceux du tissu cutané à *Borrelia garinii* (122). La relation de cause à effet entre l'infection bactérienne et le lymphome est très fortement suggérée par le fait que le traitement antibiotique et l'éradication du germe est associé à la régression de la tumeur dans 50% des cas. Il a été montré que le lymphocyte B de la tumeur ne reconnaît pas spécifiquement l'antigène bactérien. Il s'agirait en fait d'une stimulation antigénique T par le germe, responsable d'un effet collatéral d'activation B non spécifique, les lymphocytes B autoréactifs étant alors favorisés. De fait, ces lymphomes B sont associés à une activation

continue par le BCR et le microenvironnement (rôle des TLR et du CD40), responsable d'une activation NF-kappaB chronique. L'apparition d'une translocation chromosomique (t(11 ;18)(q21 ;q21) MALT1/API2, t(1 ;14)(p22 ;q32) BCL10/IGH ou t(1,2)(p22,q12) BCL10/IGK, t(14 ;18)(q32 ;q21), MALT1/IGH, t(3 ;14)(p14 ;q32) FOXP1/IGH) est responsable de l'activation NF-kappa B continue, et permet au clone tumoral d'être indépendant de son microenvironnement, devenant ainsi réfractaire au traitement antibiotique (123-125).

Les quelques études des gènes *IGHV* dans les lymphomes du MALT montrent que ces tumeurs sont caractérisés par une surreprésentation des gènes *IGHV* avec des CDR3 ayant les caractéristiques d'une immunoglobuline autoréactive (126). Les gènes *IGHV* réarrangés peuvent dépendre de l'organe et la présence d'un germe ou pas. Par exemple, il a été montré que les lymphomes du MALT des annexes oculaires sans infection par *Chlamidia psittaci* ont une surreprésentation en gène *IGHV4-34* avec statut muté (127, 128). Un remaniement *IGHV1-69* associé à la même chaîne légère kappa réarrangée pour V3-20 allèle 1 serait associé à une réactivité de facteur rhumatoïde (activité IgM anti IgG) (122).

Un papier de 2007 décrit l'utilisation du répertoire *IGHV* chez les patients atteints de lymphome du MALT gastrique stratifiés en trois groupes, le groupe des patients mis en rémission complète par le traitement antibiotique sans translocation, celui des patients résistant au traitement antibiotique sans translocation et celui des patients avec translocation chromosomique. Les *IGHV* avec remaniement des gènes *IGHV3-23* et *IGHV3-30* sont surprésentées dans le 1^{er} groupe, alors que le répertoire *IGHV* est hétérogène dans les deux autres groupes. De plus, la diversité intraclonale est supérieure dans le 1^{er} groupe par rapport aux deux autres. Ces résultats sont interprétés par les auteurs comme le témoin d'un processus d'activation lymphocytaire commun à tous les patients du premier groupe en rapport avec l'inflammation locale et l'infection bactérienne. Les patients des deux autres groupes pourraient peut-être correspondre à une maladie un peu différente (129).

4. L'exemple de l'infection par le VHC

Le virus de l'hépatite C (VHC) est responsable d'hépatites chroniques. Il infecte les hépatocytes. Il a aussi le potentiel d'infecter les lymphocytes B (130, 131). L'infection à HCV touche 170 millions de personnes dans le monde. Il existe des régions à faible prévalence

(0,01 à 0,1%) comme le nord de l'Europe et la Scandinavie et des régions à forte prévalence (2%) comme l'Italie, l'Égypte, le Japon, et le sud des États-Unis. Dans ces régions, la prévalence de l'infection est de 13% pour les patients atteints de lymphomes B indolents (132). L'HCV active sans doute le lymphocyte B grâce à sa protéine E2 qui reconnaît la molécule CD81. Ce virus, qui induit une réponse immune B et T, mute à très grande vitesse, échappant ainsi au système immunitaire. Les patients infectés par le VHC sont donc soumis à une stimulation antigénique chronique. L'infection par HCV est associée à un spectre étendu de manifestations extra-hépatiques avec principalement l'association à une cryoglobulinémie de type mixte (type II, IgM monoclonale avec une activité de type facteur rhumatoïde anti-IgG). Les cellules B produisant la cryoglobuline sont monoclonales et un pourcentage significatif de patients avec une telle cryoglobuline peuvent évoluer vers un lymphome indolent.

L'infection par HCV a été initialement rapportée comme associée aux lymphomes lymphoplasmocytaires (133), la littérature a été assez longtemps instable quant à savoir à quel type de lymphome indolent est associé ce virus. De même, à cause des différences de prévalence de l'infection par HCV selon l'origine géographique des patients, des controverses ont existé quant à savoir si ce virus est réellement associé à la lymphomagénèse B. Actuellement, et depuis l'étude internationale publiée en 2008 par le groupe de S. Sanjose, comportant 4784 patients atteints de lymphome B indolent et 6269 contrôles, il est acquis que l'HCV est associé aux lymphomes de la zone marginale, aux lymphomes lymphoplasmocytaires et aux lymphomes B diffus à grandes cellules avec des risques relatifs équivalents de l'ordre de 2,5 (134).

La fréquence de l'infection par HCV est de 15 à 20% chez les patients ayant un SMZL dans les régions géographiques à forte prévalence comme le sud de l'Europe et de 1 à 2% en Europe du nord, avec un gradient sud-nord (135). Les patients atteints de SMZL et infectés par le virus de l'hépatite C présentent souvent une cryoglobuline mixte de type II (136). Plusieurs auteurs proposent même de créer un sous-type pour ces SMZL lorsqu'il existe les 3 critères suivants : une phase leucémique à lymphocytes villeux, une cryoglobuline de type II et une infection à HCV (137). La preuve la plus évidente du rôle de ce virus dans l'établissement du lymphome est la régression du lymphome par un traitement antiviral visant à éradiquer le virus (138).

Comme dans le lymphome splénique de la zone marginale, le lymphome de la zone marginale ganglionnaire a été retrouvé associé au virus HCV principalement dans le sud de l'Europe (139). Aucune association avec le HCV n'a été décrite en France. La présence d'une cryoglobuline est associée à une infection par HCV. Tout comme le SMZL, le LPL/WM fait partie des lymphomes associés au virus de l'hépatite C dans les régions endémiques comme l'Italie, le Japon et le sud des états unis (132).

Le répertoire *IGHV* utilisé est différent en cas d'infection par HCV. Cette population utilise fréquemment le gène *IGHV1-69* pour la chaîne lourde et le gène *IGKV3-20* pour la chaîne légère (140, 141).

Trois hypothèses existent actuellement pour expliquer comment le virus contribue indirectement au processus cancéreux. Le premier mécanisme est celui d'une stimulation antigénique chronique directe. Le risque de développer un lymphome dans les régions à forte endémie pour l'HCV est plus important que dans les régions à faible endémie (132). Dans les cas de LNH avec infection à HCV, les cellules tumorales présentent un biais d'utilisation du gène *IGHV1-69* pour la chaîne lourde et du gène *IGKV3-20* pour la chaîne légère (142). Or les cellules B normales polyclonales répondant à l'antigène viral E2 des patients asymptomatiques infectés par l'HCV utilisent préférentiellement ces 2 gènes (140). Dans les cas de LNH avec infection à HCV, le BCR des cellules tumorales présente une spécificité pour la glycoprotéine E2 du HCV (143). Ceci met directement en parallèle la notion de réplication virale avec celle de lymphoprolifération anormale et suggère que les cellules tumorales dérivent de cellules qui ont subi une expansion clonale sous la stimulation virale.

Un deuxième mécanisme complémentaire a été proposé également. Des cellules présentatrices d'antigènes spécifiques de la zone marginale présenteraient des antigènes sous forme native aux cellules B au niveau des sinusoides spléniques et synthétiseraient des facteurs favorisant l'activation et la prolifération B. Cette stimulation conduirait à la formation d'une population auto-réactive ayant une activité cryoglobulinique mixte. Puis la survenue d'événements génétiques donnerait un avantage de prolifération et de survie à ces cellules (136). Ce modèle est applicable à tous les lymphomes associés à l'HCV et à une cryoglobuline mixte, les ZML et sans doute aussi aux LPL/WM (132). Ces deux mécanismes pourraient être associés en même temps. En effet, une autre étude montre que les cellules B clonales circulantes portant l'*IGHV1-69* sont capables *in vitro* de se différencier en

plasmablastes synthétisant du facteur rhumatoïde et que ces cellules présentent un transcriptome d'hyporéactivité voire d'anergie immunitaire (144).

Un troisième mécanisme n'impliquant pas le BCR est également proposé. La glycoprotéine E2 peut également se fixer sur le CD81 à la surface des cellules B. La multimérisation du CD81 par fixation de molécules E2 permet d'activer la voie JNK des cellules B naïves (145). Ce récepteur de l'E2 est aussi présent sur les lymphocytes T et assure l'activation et la prolifération T. Ainsi le CD81 conduit à une activation directe et indirecte des cellules B et contribue à une prolifération chronique des cellules B. Il a été montré également dans un système cellulaire in vitro que l'engagement du CD81 permet de protéger la cellule de l'apoptose médiée par Fas en augmentant l'expression de protéines de la famille Bcl2 (146).

Chapitre 3 : les lymphomes de la zone marginale non MALT et le lymphome lymphoplasmocytaire/maladie de Waldenström

Les lymphomes spléniques de la zone marginale

Le terme de lymphome splénique de la zone marginale a été utilisé pour la première fois par Schmid et al. en 1992 pour décrire un lymphome B de bas grade comportant une infiltration originale de la rate au niveau de la zone marginale. Dans la classification de REAL, les SMZL ont ensuite été classés avec les NMZL et les lymphomes du MALT comme entité provisoire : les lymphomes de la zone marginale. Depuis la classification OMS 2001, les SMZL sont devenus une entité à part entière (147). La dernière classification OMS 2008 a définitivement individualisé cette entité en introduisant une catégorie provisoire de lymphomes spléniques non classables, séparant ainsi les SMZL des autres lymphomes spléniques (148). Depuis, de nombreuses publications ont traité les différents aspects diagnostiques, génétiques, pronostiques et thérapeutiques des SMZL.

Epidémiologie

Chez les adultes, les SMZL représentent 2% des LNH et 20% des lymphomes de la zone marginale (149). Il s'agit d'un lymphome du sujet âgé. L'âge médian varie de 59 à 69 ans suivant les séries.

Il existe une association avec le virus de l'hépatite C (HCV). Le taux d'infection est de 15 à 20% des cas dans les régions géographiques à forte prévalence comme le sud de l'Europe et de 1 à 2% en Europe du nord, avec un gradient sud - nord (135).

Présentation clinique

Les trois caractéristiques de cette maladie sont la splénomégalie, la lymphocytose et les cytopénies.

Sa présentation clinique habituelle consiste en une splénomégalie massive volontiers isolée. Hormis de petites adénopathies du hile splénique fréquemment infiltrées par contiguïté, les infiltrations ganglionnaires périphériques ou profondes et les atteintes d'organes sont peu fréquentes mais peuvent apparaître au cours de l'évolution.

L'atteinte médullaire est quasiment constante (de 83 à 100% des cas selon les séries) (150). Au niveau sanguin, on peut observer une lymphocytose et des cytopénies de type anémie et/ou une thrombopénie. Ces cytopénies constituent le premier motif de consultation

d'un hématologue. Elles sont dues le plus souvent à la séquestration splénique plus qu'à l'infiltration médullaire ou une étiologie auto-immune. L'hyperlymphocytose peut être isolée sans splénomégalie initiale mais avec une cytologie et un immunophénotype de SMZL (cf ci-après). La splénomégalie peut alors apparaître au cours de l'évolution mais pas constamment laissant une proportion de patients avec une hyperlymphocytose stable dans le temps.

Les symptômes B, de type amaigrissement, fièvre, sueurs nocturnes ou prurit isolé, sont peu fréquents. L'augmentation des LDH est rare au diagnostic et doit faire suspecter une transformation lorsqu'elle survient. La $\beta 2$ microglobuline sérique est classiquement augmentée (151).

La présence d'un composant monoclonal est observée dans 10 à 40% des cas, le plus souvent une IgM avec un taux habituellement inférieur à 20g/L (152). Des manifestations auto-immunes sont observées chez 20% des patients à type d'anémie hémolytique auto-immune, de thrombopénie auto-immune, d'agglutinines froides ou d'anticoagulants circulants (lupiques ou cardiolipidiques), de maladies de Willebrand acquises ou d'angio-oedèmes par déficit acquis en inhibiteur de la C1 estérase (153). La présence d'un pic monoclonal ou de manifestations immunologiques est associée à des rémissions plus courtes que celles des patients sans ces caractéristiques (154).

L'évolution de la maladie est indolente avec une médiane de survie de 5 à 10 ans. Un tiers de patients présentent une maladie plus agressive avec une médiane de survie de moins de 4 ans. Plus de 60% des patients sont encore en vie à 5 ans et pour un tiers des cas, le décès n'est pas dû au lymphome mais à une autre pathologie cancéreuse ou une affection vasculaire. Une minorité de patients (10% à 20%) peuvent avoir une transformation en lymphomes B diffus à grandes cellules. La transformation survient en 12 à 85 mois et diminue alors la médiane de survie à 26 mois (152).

Diagnostic

Selon le Splenic Lymphoma Group, les critères diagnostiques minima sont soit une histologie de la rate associée à un immunophénotype ayant un score de Matutes inférieur ou égal à 2, soit une cytologie médullaire et sanguine typique associée à un immunophénotype (155). En pratique, le diagnostic de SMZL est un diagnostic d'élimination des autres lymphomes B indolents comme la LLC (Leucémie Lymphoïde Chronique), le lymphome

folliculaire, le lymphome à cellules du manteau ou le lymphome du MALT car il n'existe pas de critères diagnostiques spécifiques. Ces analyses standards doivent même être complétées parfois pour avoir un diagnostic précis.

Cytologie sanguine

La présence de cellules circulantes est classique dans les SMZL. Elle doit être étudiée en cytologie et en cytométrie en cas d'infiltration minimale. La cytologie typique est celle de lymphocytes villeux (figure 40) : ils présentent un noyau rond, une chromatine condensée et un cytoplasme basophile et des villosités polaires. La difficulté cytologique est souvent due à la présence d'une hétérogénéité cellulaire avec la coexistence de petits lymphocytes matures, de cellules lymphoplasmocytaires, de lymphocytes clivés ou de cellules plus grandes avec un cytoplasme abondant et clair. Les villosités sont fragiles et ne sont pas retrouvées lorsque le frottis est réalisé quelques heures après le prélèvement sanguin. Il est d'ailleurs recommandé de refaire un frottis sur un tube frais devant une suspicion de SMZL sans lymphocytes villeux. La présence de grandes cellules à chromatine immature associée à des nucléoles est corrélée à une progression de la maladie ou une transformation en lymphomes B agressifs (155).

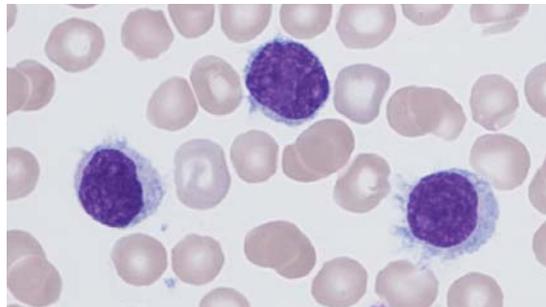


Figure 40 : lymphocytes villeux circulants

Immunophénotype sanguin ou médullaire

L'étude immunophénotypique est ici essentielle pour éliminer le diagnostic d'autres lymphomes B indolents. Les cellules tumorales sont de nature B, CD19+, exprimant une IgM de surface, avec un score de Matutes (cf annexe 2) généralement inférieur à 3 (156, 157). La classification OMS de 2001 définit les SMZL, CD20+, CD79a+ avec une expression en surface de l'IgD associée à l'IgM, mais CD5-, CD10-, CD43-, CD23- et CD103- (147). La négativité du CD5 et du CD43 permet d'exclure le diagnostic d'une LLC ou d'un lymphome

du manteau, la négativité du CD103 et du CD123 une leucémie à tricholeucocytes et la négativité du CD10 un lymphome folliculaire. La description phénotypique a été précisée dans la classification 2008 et a toléré plus de variations avec une coexpression des IgM et IgD en surface typique mais non constante, un FMC7+/-, un CD43 +/- (148). L'intensité des immunoglobulines est modérée à forte, l'intensité du CD79b est forte, ceci permet de différencier les SMZL des LLC qui présentent une intensité faible de ces anticorps (155). Les cellules sont aussi CD22+, CD24+, et CD27+. L'annexine 1 est négative. En pratique, certains anticorps ne sont pas toujours négatifs. Le CD5 est trouvé positif dans 15 à 20% des cas. Le CD23 est décrit comme positif dans 30% des cas et le CD11c peut être faiblement positif dans 33% des cas (155).

Myélogramme

L'infiltration médullaire est variable, le plus souvent faible. La morphologie des lymphocytes est plus facile à étudier dans le sang qui présente en général moins d'artéfact que la moelle. La différenciation plasmocytaire est plus fréquente dans la moelle que dans le sang et lorsqu'elle est importante, pose le diagnostic différentiel avec une maladie de Waldenström.

Biopsie ostéo-médullaire

L'histologie de la moelle osseuse est indispensable pour avoir un diagnostic précis. L'infiltration de la moelle osseuse est constante dans les SMZL, elle est mieux détectée par immunohistologie. A la phase initiale de la maladie, l'infiltration médullaire est discrète car elle concerne moins de 20% des cellules. L'infiltration est typiquement intra-sinusoïdale et concerne plus de 75% des cas : on observe alors l'image caractéristique de cellules tumorales rangées en file indienne dans les petits sinusoïdes (figure 41). L'infiltration devient nodulaire au cours de l'évolution notamment après splénectomie. Dans les cas de maladie avancée, l'association d'une infiltration intra-sinusoïdale avec une infiltration nodulaire est très caractéristique même si elle n'est pas complètement spécifique. Dans une minorité de cas, l'infiltration interstitielle peut exister mais elle est toujours associée à une infiltration intra-sinusoïdale et/ou nodulaire. La cytologie est semblable à celle des ganglions. Le plus souvent les follicules de la moelle ont conservé un centre germinatif résiduel entouré d'une couronne

de cellules de la zone marginale. Des caractéristiques plasmocytoïdes sont décrites dans un petit nombre de cas.

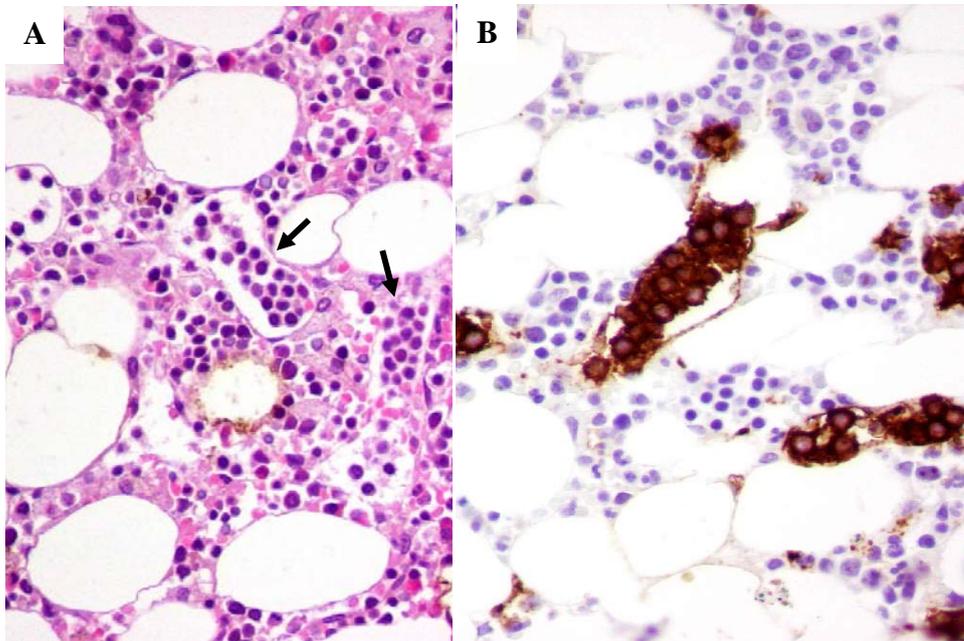


Figure 41 : biopsie ostéomédullaire de SMZL

Infiltration médullaire de type intra-sinusoidale (A) et immunomarquage par le CD20 (B)
Source : photographies non publiées de M. Parrens

Histologie splénique

L'histologie de la rate est l'outil diagnostique de référence mais n'est cependant pas suffisante à elle seule. De plus elle n'est pas toujours disponible car tous les patients ne nécessitent pas une splénectomie.

A l'examen anatomo-pathologique, une infiltration caractéristique de la rate est nodulaire, elle touche les centres germinatifs de la pulpe blanche avec une prolifération dans la zone marginale périfolliculaire qui détruit le manteau et entoure le centre germinatif. Cytologiquement, il peut persister un centre germinatif résiduel, composé de petits lymphocytes à noyaux ronds ou légèrement irréguliers, tandis que la zone périphérique marginale est composée de cellules plus grandes à cytoplasme clair proches des cellules de la zone marginale normales (158). Le plus souvent le nodule est composé uniquement de cellules de type zone marginale sans centre germinatif résiduel (148). En fait, trois aspects ont été décrits, nodulaires, nodulaires et diffus et diffus (figure 42). Il peut exister aussi des immunoblastes dispersés dans la pulpe blanche (grandes cellules à gros noyaux et des

nucléoles proéminents). Les capillaires sinusoides situés au niveau des ganglions du hile splénique sont dilatés et infiltrés par le lymphome avec une destruction des centres germinatifs au profit d'une population mixte de petits lymphocytes et de cellules de la zone marginale. La pulpe rouge de la rate est également infiltrée à un degré variable qui n'atteint jamais celui des lymphomes de type SRPL, groupe décrit depuis 2008 (cf paragraphe du diagnostic différentiel).

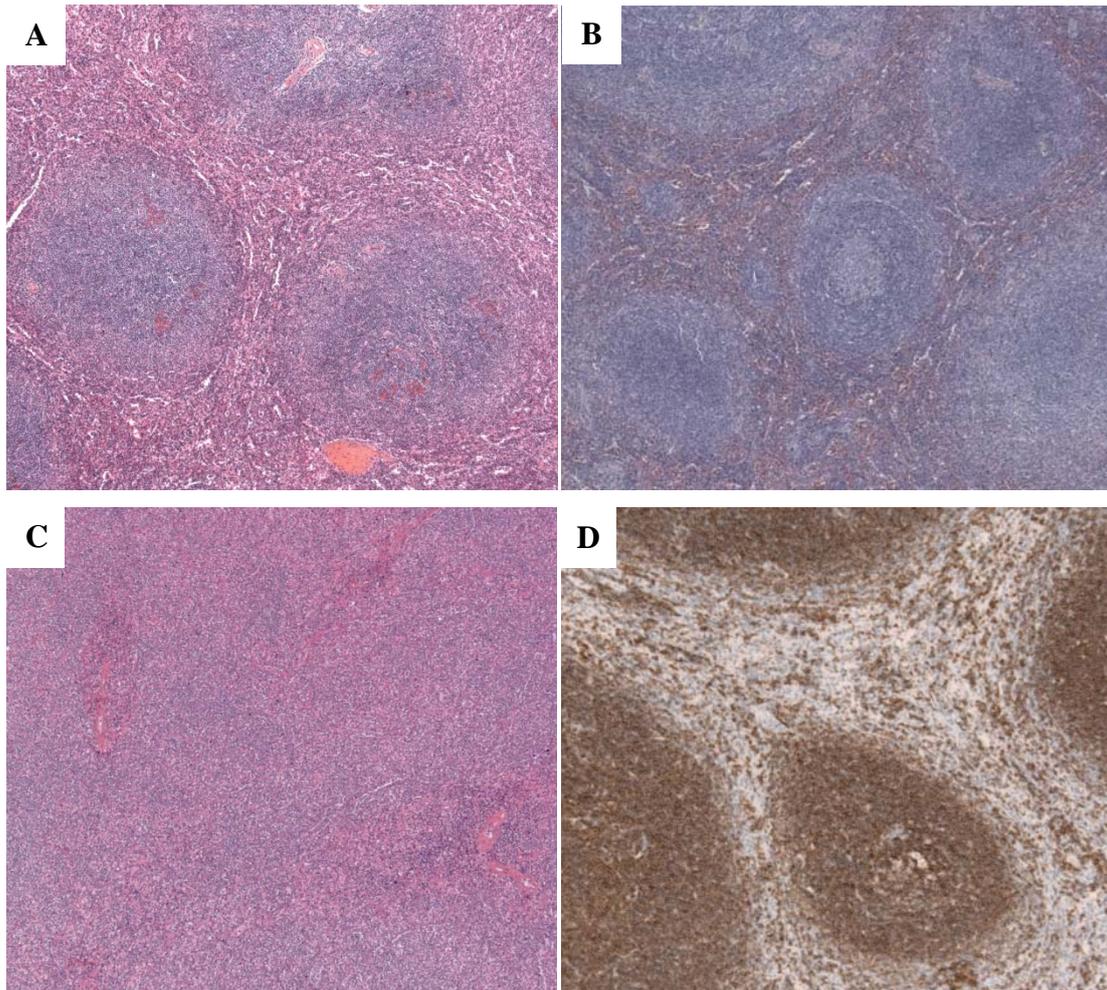


Figure 42 : histologie splénique dans un SMZL

Infiltration de type nodulaire (A), de type nodulaire et diffus (B), de type diffus (C), immunomarquage par le CD20 (D).

Sources : photographies non publiées de B. Petit.

Cytogénétique et anomalies moléculaires

La cytogénétique des lymphomes spléniques de la zone marginale a été étudiée depuis de nombreuses années mais les études récentes portant sur de grandes séries ont permis de consolider le profil cytogénétique de cette entité en termes de fréquence des anomalies et de

précisions des points de cassure. La cytogénétique est clonale dans 72% des cas. Les anomalies sont le plus souvent des gains ou des pertes chromosomiques, les translocations ne sont pas récurrentes dans ce lymphome. En particulier les translocations impliquant les loci des immunoglobulines, *IGH* (14q32), *IGK* (2p12) ou *IGK* (22q11) sont peu communes. Le caryotype est retrouvé complexe dans 53% des cas.

L'anomalie la plus typique et la plus fréquente est l'anomalie du chromosome 7 (45% des patients), sous forme de délétion principalement (20 à 30%) ou de translocation (159, 160). La délétion est interstitielle et concerne une région en allant du 7q21 jusqu'au 7q36, les points de cassure les plus fréquents étant le 7q22 et le 7q31.

L'anomalie du 7q31 est décrite comme pratiquement spécifique dans les grandes études récentes des syndromes lymphoprolifératifs B : elle a été très peu décrite dans la Leucémie Lymphoïde Chronique (161) et on la retrouve principalement dans un autre lymphome splénique, le SRPL (162). La délétion en 7q31 entrainerait la perte de *POT1*, un gène impliqué dans la protection des télomères et le maintien de leur longueur (3 cas décrits) (163). La région du 7q31 contient aussi 2 microARN, les *hsa-mir-29a* et *hsa-mir-29b-1* qui sont décrits comme sous-exprimés dans le SMZL (164). *MIR29b1* serait associé à la délétion du 7q31, tandis que la sous-expression de *MIR29a* serait due à un autre mécanisme probablement épigénétique (165).

La délétion en 7q36 induirait la perte de *SHH*, une protéine de la famille de Hedgehog, impliquée dans la prolifération des cellules B, notamment des cellules B du centre germinatif (4 cas décrits) (163).

L'anomalie de nombre la plus fréquente est la trisomie partielle ou complète du chromosome 3 (25% des cas). La trisomie 3 est commune dans tous les lymphomes de la zone marginale mais dans les SMZL, la trisomie est le plus souvent partielle localisée sur le 3q allant du q13 au q29. Cette zone étendue sur plus de 43 Mb, la diversité des points de cassure (plus de 8 ont été décrits), les chromosomes partenaires impliqués dans les remaniements ainsi que l'association fréquente avec un caryotype complexe indiquent que l'anomalie 3q correspondrait à un évènement secondaire parmi les altérations chromosomiques. La variabilité du gain en 3q suggère aussi un effet dosage génique plus qu'une dérégulation d'un gène candidat : en augmentant le nombre de gènes présents dans cette région (166). L'anomalie aurait un impact sur le développement et/ou la progression de la maladie.

D'autres anomalies non spécifiques ont été reportées : la trisomie 18, la trisomie 12, l'isochromosome 17q, la délétion 13q14, la délétion 6q ou des anomalies de structure du chromosome 1.

La délétion de TP53 a été rapportée dans 14% des cas par une étude récente de CGH-array. Elle est fréquemment retrouvée dans les caryotypes complexes et n'est pas particulièrement associée à la délétion 7q (167).

Le statut mutationnel de la région variable des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobuline (*IGHV*)

Les premières études ont montré la présence de mutations somatiques suggérant ainsi que les cellules tumorales dérivait de cellules B mémoires. Aujourd'hui de grandes séries ont été étudiées permettant d'avoir une image assez précise du répertoire IG utilisé dans les SMZL. Une étude européenne très récente en particulier a consisté en une analyse multicentrique rétrospective de 337 cas de SMZL (168).

Il existe un biais de répertoire dans les SMZL avec une utilisation préférentielle de certains *IGHV* différente de la normale. Presque la moitié des cas n'utilisent que 3 gènes *IGHV* : l'*IGHV1-2* dans 25% des cas, l'*IGHV4-34* dans 13% des cas et l'*IGHV3-23* dans 8% des cas. Le biais d'utilisation des *IGHV* est plus important encore parmi les cas diagnostiqués sur une histologie splénique avec 32% d'*IGHV1-2*. Parmi ces *IGHV1-2*, il existe une surreprésentation d'un seul allèle, le *IGHV1-2*04*, présent dans 92% des *IGHV1-2*. Le deuxième allèle représenté est le *IGHV1-2*02* dans 8% des cas. Ce biais allélique est remarquable. Dans les autres pathologies où le *IGHV1-2* est utilisé (LLC le plus souvent), il existe une proportion semblable entre l'allèle 02 et 04 du *IGHV1-2* (114).

Cette même étude multicentrique identifie 13 % des cas de SMZL avec *IGHV* strictement non mutés. Les cas mutés sont majoritaires mais le taux de mutations diffère suivant le gène *IGHV* utilisé. Les *IGHV1-2*04* sont le plus souvent peu mutés, entre 0,1 à 3% de mutations (72% des *IGHV1-2*), les *IGHV3* sont très majoritairement mutés, avec un taux supérieur à 3% tandis que les *IGHV4-34* possèdent des taux de mutation hétérogènes avec une répartition égale entre les catégories non mutées, peu mutées inférieur à 3%, mutées supérieur à 3%.

Comme dans la LLC, des séquences *IGHV* presque identiques ont été retrouvées : elles comportent alors un même *IGHV*, *IGHD* et *IGHJ* et la région HCDR3, responsable de la liaison à l'antigène est très similaire d'un patient à l'autre. Ces motifs stéréotypés ont été regroupés en 3 catégories spécifiques des SMZL, et en 2 catégories non spécifiques contenant des motifs déjà identifiés dans d'autres pathologies comme la LLC (169). Ces motifs canoniques suggèrent fortement qu'une sélection antigénique avec un antigène commun pourrait contribuer au développement des SMZL. Le motif le plus fréquent implique le *IGHV1-2*04*, le *IGHD3-3* ou *IGHD3-10* et le *IGHJ4*02* (tableau 1). Le segment HCDR3 est chargé positivement, hydrophobe et remarquablement long. Ce sont 3 critères que l'on prête généralement aux anticorps polyréactifs (170). Des clones comportant ce type VDJ canonique ont été étudiés : ils produisent effectivement des auto-anticorps polyréactifs. Leur réactivité est faible mais ils reconnaissent des antigènes intracytoplasmiques de nombreux types cellulaires, allant des cellules épithéliales de divers organes aux cellules hématopoïétiques comme les précurseurs de la lignée rouge, les macrophages ou les cellules lymphoïdes en passant par les cellules mésenchymateuses comme les cellules musculaires lisses. Il existe également une réactivité avec un sérum humain (171).

Tableau 1 : principales caractéristiques du motif canonique impliquant l'*IGHV1-2*04* de différentes séries de patients issues de la littérature et de notre travail.

VH	JH	DH	Séquences en Aa du HCDR3																										
V1-2*04	J5*02	D3-3*01	A	R	G	K	-	-	R	I	T	I	F	G	V	V	I	E	G	R	A	-	T	W	F	D	P	Gachard et al.	
V1-2*04	J5*02	D3-3*01	A	R	G	L	R	R	S	I	A	I	F	G	V	V	-	P	G	-	-	-	W	F	D	L			
V1-2*04	J2*01	D3-3*01	A	R	G	N	K	-	-	I	S	I	F	G	V	V	I	R	G	R	D	W	-	Y	F	D	L		
V1-2*04	J2*01	D3-3*01	A	R	G	P	-	-	R	I	T	I	F	G	V	V	T	R	G	R	-	Y	W	Y	F	D	L		
V1-2*04	J4*02	D3-3*01	A	R	G	A	T	-	-	I	T	I	L	G	V	V	I	R	G	R	G	W	-	Y	F	D	Y		
V1-2*04	J4*02	D3-3*01	A	R	G	K	S	-	-	I	T	I	L	G	V	V	I	T	G	R	D	Y	-	Y	F	D	S		
V1-2*04	J4*02	D3-3*01	A	R	G	R	-	-	R	I	T	I	F	G	V	V	I	T	G	R	A	S	-	Y	F	D	Y		
V1-2*04	J4*02	D3-9*01	A	R	G	G	P	-	-	N	T	I	L	-	S	L	I	S	-	R	K	S	F	Y	F	D	Y		
V1-2*04	J4*02	D3-16*01	A	K	S	Y	N	-	-	M	I	T	I	-	G	V	I	W	G	R	G	-	H	Y	L	D	Y		
V1-2*04	J4*02	D3-3*01	A	R	P	S	G	G	-	-	I	T	I	F	G	V	V	R	N	G	G	G	G	Y	Y	F	D	Y	
V1-2*04	J6-2	D3-3*01	A	R	G	D	-	-	K	I	T	I	F	G	V	V	L	G	R	G	G	L	Y	G	M	D	V		
V1-2*04	J2*01	D3-3*01	A	R	G	P	-	-	H	I	T	I	F	G	V	V	I	I	G	R	D	-	W	Y	F	D	L	Warsame et al.	
V1-2*04	J3*02	D3-3*01	A	R	G	P	L	-	-	I	T	I	F	G	V	V	I	R	G	R	M	-	G	A	F	D	I		
V1-2*04	J4*02	D3-3*01	A	R	G	P	-	-	R	I	S	M	I	G	V	V	I	N	G	R	G	G	A	-	F	D	Y	Zibellini et al.	
V1-2*04	J4*02	D3-3*01	A	R	G	D	-	-	R	I	T	I	F	G	V	V	I	G	N	S	R	H	G	G	F	D	Y		

Les cellules en noires correspondent aux acides aminés basiques, en gris foncé aux acides aminés non polaires, en gris clair aux acides aminés polaires non chargés et en rouge aux acides aminés acides. Les caractères en gras correspondent aux séquences VDJ

Le répertoire *IGHV* utilisé est différent en cas d'infection par HCV. Les patients infectés présentent quasi constamment une cryoglobuline mixte de type II (137). L'IgM est monoclonale et possède une activité de type facteur rhumatoïde anti-IgG (136). L'infection

est associée à une expansion clonale de cellules B IgM+, IgK+, CD27+, CD21+faible. Cette population utilise fréquemment le gène *IGHV1-69* pour la chaîne lourde et le gène *IGKV3-20* pour la chaîne légère (140, 141).

Diagnostic différentiel

Certains lymphomes B indolents, primitivement ganglionnaires peuvent avoir, au cours de l'évolution, une infiltration splénique avec une morphologie proche de celle des SMZL à infiltration splénique primitive. Le diagnostic différentiel peut se poser avec les lymphomes B indolents infiltrant la rate notamment la pulpe blanche. Dans ce type d'infiltration, il ya une accentuation de la zone marginale normale qui peut ressembler à une infiltration par un lymphome de la zone marginale. Si bien que le diagnostic différentiel des SMZL avec les autres lymphomes B indolents nécessite l'intégration des données cliniques, morphologiques, immunophénotypiques et génétiques. Egalement les cellules tumorales peuvent avoir un certain degré de différenciation plasmocytaire posant alors le diagnostic différentiel avec un lymphome lymphoplasmocytaire.

L'immunomarquage, la morphologie de l'infiltration et la cytologie des cellules tumorales sont extrêmement utiles pour le diagnostic différentiel dans les lymphomes B à petits cellules à infiltration splénique (155). Dans le lymphome folliculaire, la rate comporte des nodules de taille variable comportant des centrocytes et des centroblastes. L'expression positive du CD10 et de Bc6 permet d'orienter le diagnostic vers un lymphome folliculaire. Dans le lymphome du manteau, la rate peut être infiltrée de façon nodulaire dans la pulpe blanche et diffuse dans la pulpe rouge par une population homogène de cellules du manteau (grandes cellules nucléolées) qui expriment la cycline D1. Dans la LLC, l'infiltration splénique est située dans la pulpe blanche et rouge avec disparition des follicules, composée de petits lymphocytes matures associées parfois à des prolymphocytes ou des paraimmunoblastes. Les cellules tumorales de la LLC expriment le CD5, le CD43 et l'IgD en surface. Le lymphome du MALT peut présenter également une atteinte splénique. L'infiltration est alors micronodulaire avec une zone du manteau préservée tandis qu'il existe une extension de la zone marginale. L'IgD peut être alors un marqueur utile dans le diagnostic différentiel car l'expression de l'IgD est très rare dans le lymphome du MALT alors elle est fréquente dans les SMZL.

Il existe d'autres lymphomes B à petites cellules comportant une infiltration splénique ne correspondant pas à un SMZL ni à aucun type connu. Parmi ceux-ci, deux commencent à être décrits et sont définis dans la classification OMS 2008 comme des entités provisoires : le lymphome de la pulpe rouge splénique (SRPL) et la leucémie à tricholeucocytes variante (HCL-v). En dehors de ces deux types provisoires, les autres lymphomes B spléniques à petites cellules doivent être classés dans la catégorie des leucémie/lymphome B spléniques inclassables (172).

Le SRPL est caractérisé par la présence de lymphocytes villeux circulants et une infiltration majeure de la pulpe rouge de la rate (173). L'infiltration est intra-sinusoïdale associée parfois à une infiltration interstitielle ou nodulaire. Les cellules tumorales expriment fréquemment une IgG seule ou en association avec un autre isotype. Elles présentent aussi une faible expression du CD103 et une expression modérée du CD11c et du CD22 (150).

La HCL-v présente un tableau clinico-biologique proche du SRPL avec une splénomégalie, une hyperlymphocytose sans pancytopenie et une atteinte médullaire. Les frottis sanguins ou médullaires montrent une infiltration homogène par les prolymphocytes à nucléole proéminent. Comme dans la leucémie à tricholeucocytes standard, les cellules tumorales expriment fortement le CD11c, moins fortement le CD103 mais elles diffèrent par la négativité du CD123, du CD25 et de l'annexine 1 (174). L'immunoglobuline de surface est souvent une IgG qui peut être associée à un autre isotype.

Les lymphomes ganglionnaires de la zone marginale

Initialement appelé lymphome B monocytoïde ganglionnaire par Sheibani et al. en 1986 (175), Cousar et al. l'ont désigné sous le terme lymphome parafolliculaire en 1987 en raison de l'aspect morphologique de l'infiltration (176). En 1988, Piriš et al. ont fait le lien avec le compartiment de la zone marginale (177) ce qui a permis de l'introduire dans la classification de Kiel en 1990. La classification OMS 2001 le présente comme une entité provisoire (178) puis en 2008, cette même classification l'individualise définitivement comme un des trois lymphomes de la zone marginale (179). Il s'agit du lymphome de la zone marginale le moins bien décrit.

Epidémiologie

C'est un lymphome rare, il représente 1 à 2% des lymphomes et 10% des ZML (179, 180). L'âge médian se situe entre 50 et 64 ans avec un sexe ratio différent suivant les séries. Comme dans le lymphome splénique de la zone marginale, le lymphome ganglionnaire a été retrouvé associé au virus HCV principalement dans le sud de l'Europe (139). Aucune association avec le HCV n'a été décrite en France.

Présentation clinique

La majorité des patients présente une maladie disséminée avec une atteinte ganglionnaire périphérique (fréquemment inguinale et cervicale) et profonde (le plus souvent abdominale et thoracique). Même si l'envahissement médullaire est moins fréquent que dans les SMZL, il est décrit le plus souvent dans la moitié des cas avec des variations allant de 15 à 62% des cas (181, 182). L'atteinte sanguine et les cytopénies sont rares. Un composant monoclonal est peu fréquemment détecté (10% des cas). La présence de symptômes B est rare. Une élévation de la β_2 microglobuline existe chez un tiers des patients. La présence d'une cryoglobuline est associée à une infection par HCV. Contrairement aux autres lymphomes de la zone marginale et en dehors d'une anémie hémolytique auto-immune, aucune manifestation auto-immune n'a été décrite dans ce lymphome (180).

Histologie ganglionnaire et médullaire

En général, malgré l'infiltration tumorale, l'architecture ganglionnaire est préservée au moins en partie (figure 43A). Le type d'infiltration ganglionnaire est hétérogène et peut prendre jusqu'à cinq aspects différents (183) : nodulaire identique à celui décrit dans les SZML avec ou sans persistance d'un centre germinatif résiduel, inter-folliculaire avec envahissement de l'espace entre les follicules ou autour des sinusoides, péri-folliculaire avec une hyperplasie de la zone marginale, folliculaire inverse avec une zone folliculaire centrale sombre et périphérique claire, ou diffuse avec une disparition complète de l'architecture ganglionnaire mais toujours associée à une infiltration nodulaire dans ce dernier cas. Différents types d'infiltration peuvent aussi coexister au sein d'un même cas. Au niveau morphologique, la population tumorale est composée de plusieurs types cellulaires (149) : des petits lymphocytes matures, des cellules de la zone marginale (de petite taille avec un noyau rond, une chromatine mottée et un cytoplasme clair) mais aussi des cellules lymphoplasmocytaires, des plasmocytes ou des cellules monocytoïdes (de taille moyenne à rapport nucléo-cytoplasmique élevé avec un noyau irrégulier et un cytoplasme clair) (figure 43B et 43C). Cette dernière population peut être prédominante dans un faible nombre de cas (10%) mais le plus souvent, elle est minoritaire. Contrairement aux autres lymphomes de la zone marginale, il existe souvent un contingent de grandes cellules de type centroblaste ou immunoblaste, qui peut représenter plus de 20% des cellules totales. Cette population est responsable d'un indice mitotique fréquemment élevé sans pour autant classer le lymphome en lymphome B diffus à grandes cellules du fait du contexte mixte petites cellules-grandes cellules (182). Enfin des cellules folliculaires dendritiques sont toujours présentes.

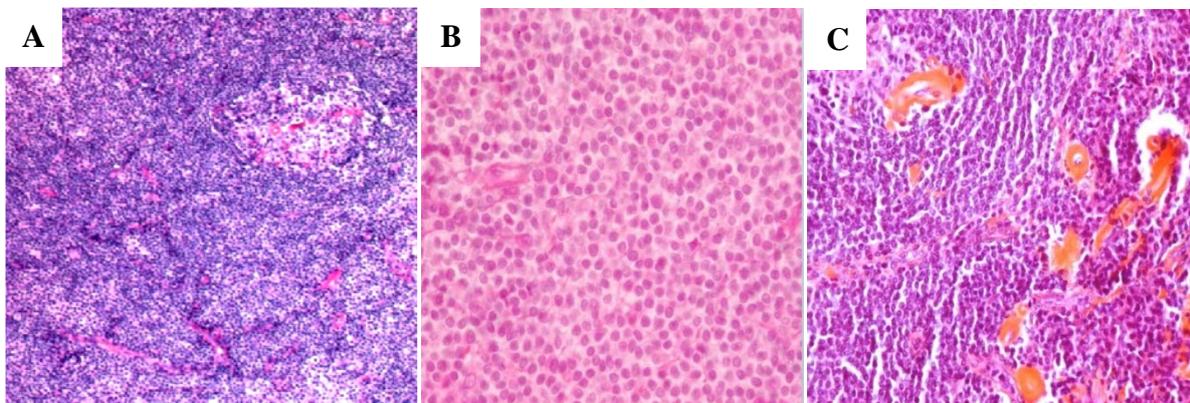


Figure 43 : biopsie ganglionnaire de NMZL

Infiltration tumorale avec structure ganglionnaire résiduelle (A), morphologie sans différenciation lymphoplasmocytaire (B), ou avec différenciation lymphoplasmocytaire (C)

Source : photographies non publiées de I. Soubeyran.

Bien que peu documentée, l'infiltration médullaire, lorsqu'elle existe, peut être de plusieurs types, nodulaire, paratrabéculaire ou interstitiel. L'infiltration intra-sinusoïdale typique du lymphome splénique de la zone marginale a aussi été rapportée dans des pourcentages de cas extrêmement variables allant de 0 à 57% des cas (181, 184). Comme sur l'histologie ganglionnaire, la biopsie ostéomédullaire montre un contingent de petites cellules mais aussi de grandes cellules, de cellules monocytoïdes ainsi qu'une différenciation plasmocytaire.

Immunophénotype

Les cellules tumorales expriment les marqueurs pan-B CD19, CD79a et CD20 et l'IgM fortement. L'IgD est le plus souvent négative. Campo et al. ont décrit l'expression de l'IgD selon deux types : un type dit splénique (sans infiltration de la rate) qui présente une infiltration nodulaire et une IgD positif et un type MALT avec une infiltration parafolliculaire et péri-sinusoïdale et une IgD négative (185). Le CD43 est positif dans 50% des cas. Les marqueurs CD5, CD23, CD10, bcl-6 et cycline D1 sont négatifs. Bcl2 est le plus souvent positif, il marque alors les follicules qui normalement sont négatifs mais qui sont ici envahis par des cellules tumorales positives. Les cellules monocytoïdes ont un phénotype différent, proche des cellules naïves, avec Bcl2-, p21+, cycline E+ et IRTA1+ (186).

Cytogénétique et anomalies moléculaires

Peu d'études ont été réalisées spécifiquement sur ce type de lymphome. Plusieurs raisons expliquent le manque de données cytogénétiques : la faible fréquence du lymphome, la difficulté d'obtenir des métaphases à partir d'un prélèvement tumoral majoritairement infiltré et l'individualisation récente du NMZL. Les études cytogénétiques conventionnelles ont bien souvent porté sur les lymphomes de la zone marginale sans individualiser spécifiquement le type NMZL selon les critères actuels de classification (187-189). Deux études récentes, de 20 et 25 cas, ont consisté en des techniques de haute résolution (CGH-array) (167, 190). Cependant aucune anomalie cytogénétique typique n'a été décrite.

La majorité des cas présente un caryotype clonal, le plus souvent complexe. Les anomalies récurrentes sont non spécifiques car partagées par d'autres lymphomes. La trisomie 3 et trisomie 18, sont décrites dans 15 à 24 % des cas mais sont non concomitantes au sein

d'un même caryotype contrairement aux lymphomes du MALT ou LPL/WM (167). Les techniques de haute résolution montrent que, pour la trisomie 3, les gains touchent le locus 3p25 et la région du 3p14-q29 impliquant alors les gènes *FOXP1*, *NFKBIZ*, *BCL6* avec une surexpression de leurs transcrits. Pour la trisomie 18, le gain est focalisé en 18q23 impliquant *NFATC1* avec surexpression du transcrit également. La trisomie 12 est retrouvée plus fréquemment dans les NMZL comparés aux autres ZML. L'étude la plus récente la décrit dans 25% des cas avec un gain de 12q13 à q21 (167). Des anomalies sur le chromosome 6 sont retrouvées dans 16% des cas en haute résolution (190). Elles portent à la fois sur le bras court avec de gains en 6p21 et le bras long avec des pertes en 6q23 impliquant *A20*. Le trait le plus caractéristique est le fait que certaines anomalies cytogénétiques ne sont pas identifiées dans les NMZL, notamment les translocations caractéristiques du lymphome du MALT ou la délétion 7q fréquemment retrouvées dans les SMZL (191). L'analyse de TP53 en FISH, dans des séries antérieures à la classification OMS 2008, a montré qu'environ 10% des cas présentaient une délétion hétérozygote (187, 189) mais l'étude récente de Braggio et collaborateurs, comportant 20 cas de NMZL, n'a rapporté aucune mutation de TP53 contrairement aux cas de SMZL et de lymphome du MALT (167).

Une étude moléculaire récente de 15 cas de NMZL couplant une analyse transcriptomique à une analyse de micro-ARN a montré que la signature des NMZL était différente de la signature des lymphomes folliculaires (192). L'analyse transcriptomique montre une surexpression de 264 gènes et une sous-expression de 184 gènes. La signature NMZL est enrichie en gènes reliés aux interleukines (IL6, IL2 et IL10), aux intégrines (CD40), à un signal de survie (avec les voies MAPK, TNF, TGFβ et NF-κB). L'analyse des micro-ARN montrent une sous-régulation de *miR-532-5p* qui pourrait avoir pour conséquence une activation des gènes *SYK*, *LYN*, and *RELA* et une surexpression de *miR-221*, *miR-555*, and *miR-29c* qui pourraient entraîner une répression des gènes *LMO2* et *CD10*. Les NMZL produisent une signature de type zone marginale normale et cellule B mémoire (*TACI*, *CD44*, *let-7*) alors que les lymphomes folliculaires présentent une signature de type centre germinatif. De nouveaux marqueurs génétiques sont proposés pour le diagnostic différentiel avec le lymphome folliculaire : *TACI*, *CHIT1*, *CD44*, *CD82*, *TGFB1*, *let-7f*, *miR-223* et *miR-221*.

Le statut mutationnel des *IGHV*

L'étude *IGHV* a porté sur des études limitées à de petits nombres de cas, toutes réalisées avant la dernière classification OMS, ce qui laisse à penser que le classement en zone marginal ganglionnaire n'est pas optimal (142, 193-197). Le répertoire utilisé est hétérogène. Les *IGHV3* et *IGHV4* sont utilisés dans respectivement 36 à 80% et 20 à 75% des cas. L'*IGHV4-34* est souvent impliqué dans la famille des gènes *IGHV4*. La plus grande majorité des cas est mutée. Le profil des cas associés à une infection au virus de l'hépatite C est à part, il présente un biais d'utilisation du *IGHV4-34* et *IGHV1-69* (142). Leurs séquences *IGHV* sont mutées et présentent en général une pression de sélection.

Tableau 2 : récapitulatif de l'étude des *IGHV* dans les différentes séries de NMZL

Séries publiées (année)	Nombre de cas	Statut muté (>2%)	Pourcentage d'utilisation des gènes ou familles de gènes					
			V1	V1-69	V3	V3-23	V4	V4-34
Tierens et al. (1998)	4	100%	25%	25%	0%	0%	75%	25%
Miranda et al. (1999)	5	100%	0%	0%	60%	0%	40%	0%
Conconi et al. (2001)	8	75%	0%	0%	50%	13%	38%	13%
Marasca et al. (2001)	10	90%	30%	30%	20%	0%	40%	30%
Camacho et AL. (2003)	5	80%	0%	0%	80%	0%	20%	0%
Traverse-Glehen et al. (2005)	14	86%	14%	0%	36%	7%	50%	36%

Source : (142, 193-197)

Lymphome lymphoplasmocytaire / maladie de Waldenström

Dans la classification OMS 2008, le lymphome lymphoplasmocytaire (LPL) est défini comme une néoplasie B composée de petits lymphocytes, de lymphoplasmocytes et de plasmocytes, infiltrant généralement la moelle, parfois la rate et les ganglions, et ne répondant pas aux critères diagnostiques des autres lymphomes B indolents pouvant comporter une composante lymphoplasmocytaire (198). Il s'agit donc d'un diagnostic d'exclusion. Bien qu'il y ait souvent un pic monoclonal associé, en général de type IgM, le pic n'est pas indispensable au diagnostic.

La maladie de Waldenström (MW) est définie, quant à elle, comme un lymphome lymphoplasmocytaire ayant une atteinte médullaire constante et un pic IgM quel qu'en soit le taux.

Epidémiologie

Le LPL/WM représente 1 à 2% des hémopathies et 6% des syndromes lymphoprolifératifs. Il s'agit d'un lymphome du sujet âgé à prédominance masculine, l'âge médian est de 63 ans.

Il existe une prédisposition familiale pour 20% des patients présentant une maladie de Waldenström. Les patients concernés sont alors plus jeunes et ont un envahissement médullaire majeur.

Les patients présentant une gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) de type IgM ont un risque de transformation en LPL/WM multiplié par 46 (199).

Tout comme le SMZL, le LPL/WM fait partie des lymphomes associés au virus de l'hépatite C dans les régions endémiques comme l'Italie, le Japon et le sud des états unis (132).

Présentation clinique

Le LPL et la MW ont des présentations cliniques légèrement différentes (200). Le LPL se présente le plus souvent comme un lymphome disséminé avec une atteinte médullaire, ganglionnaire et splénique. L'infiltration extra-ganglionnaire et la phase leucémique sont

rare. La MW présente des symptômes cliniques hétérogènes. 30% des patients présentent une forme indolente asymptomatique. Pour les autres, comme pour le LPL, les symptômes sont dus à l'infiltration tumorale avec des symptômes B, des cytopénies, une atteinte ganglionnaire ou une organomégalie. Par contre, d'autres symptômes ne sont attribuables qu'à l'immunoglobuline monoclonale avec un syndrome d'hyperviscosité, des symptômes à la présence d'une cryoglobuline ou une agglutinine froide, des neuropathies ou une amylose.

L'infiltration tumorale est systématiquement médullaire. Elle est alors fréquemment responsable de cytopénies. Mais le syndrome tumoral peut toucher d'autres sites : des adénopathies sont retrouvées dans 10 à 20% des cas, une hépatomégalie dans 20% et une splénomégalie dans 15% des cas. L'atteinte d'autres organes est rare. Elle consiste en des infiltrats ou nodules pulmonaires ou épanchements pleuraux, des infiltrats du tube digestif, atteintes oculaires, infiltrats rénaux et lésions ostéolytiques.

Les symptômes cliniques liés à l'immunoglobuline sont dus à plusieurs de ces caractéristiques ; ses propriétés physico-chimiques, son activité auto-immune ou encore sa capacité à faire des dépôts dans différents tissus (les glomérules rénaux, l'intestin ou la peau).

L'IgM circulante est pentamérique et peut fixer des molécules d'eau sur ses résidus carbohydrates. Lorsque le taux d'IgM plasmatique est conséquent, en général à partir de 30g/L, cette propriété physico-chimique entraîne un ralentissement de la circulation dans les microvaisseaux et une diminution de la déformabilité des globules rouges responsables du syndrome d'hyperviscosité. Présent chez 15% des patients au diagnostic, même si une importante variabilité interindividuelle est observée, le syndrome d'hyperviscosité peut occasionner des céphalées, des épistaxis, des hémorragies gastro-intestinales, des troubles visuels. D'autres signes, cardiaques ou neurologiques peuvent survenir.

Dans 20% des cas, l'immunoglobuline est aussi une cryoglobuline de type I, elle présente alors la capacité de précipiter au froid et déclenche, dans 5% des cas, des symptômes de type syndrome de Raynaud, arthralgies, purpura ou ulcères cutanés.

Enfin parmi ces propriétés physico-chimiques, l'IgM peut interagir avec les plaquettes et les facteurs de coagulation occasionnant alors des thrombopathies et des anomalies de la coagulation, de type hémophilie ou maladie de Willebrand acquise ou des défauts de la fibrinof ormation.

L'IgM peut être également responsable de différentes atteintes auto-immunes : des anémies hémolytiques auto-immunes dans 10 à 15% des cas, des neuropathies périphériques dans 15 à 30% des cas avec un tableau clinique variable en fonction de l'activité anticorps, des glomérulonéphrites ou encore une maladie des agglutinines froides due à une activité anticorps dirigé contre des IgG polyclonales avec activité facteur rhumatoïde donnant alors une cryoglobuline de type II.

Hémogramme

L'anomalie la plus fréquente est une anémie, classiquement normochrome, normocytaire. Le taux moyen de l'hémoglobine est de 10g/dL au diagnostic. Son origine est probablement multifactorielle. Son étiologie est en premier lieu, l'hémodilution ou le syndrome d'hyperviscosité lorsqu'il existe un pic IgM important mais elle peut être centrale, due à l'infiltration médullaire ou la sécrétion de cytokines. Lorsqu'elle est régénérative, elle peut être due à l'hémolyse (200).

D'autres anomalies de l'hémogramme sont surtout décrites : une thrombopénie due à l'infiltration médullaire, une splénomégalie ou une activité anti-plaquette de l'immunoglobuline monoclonale, plus rarement une neutropénie. On peut voir une hyperleucocytose mais qui reste discrète. Le plus souvent la formule leucocytaire est normale.

Biopsie ostéomédullaire et myélogramme

La biopsie médullaire est caractérisée par une infiltration de type interstitielle mais aussi nodulaire, diffuse. Les types mixtes sont communs dans cette pathologie contrairement à l'infiltration intra-sinusoïdale isolée des SMZL (201). L'infiltration est composée d'une prédominance de petits lymphocytes matures associés à des cellules plasmocytaires et des lymphocytes lymphoplasmocytoïdes (figure 44A). Des agrégats paratrabéculaires peuvent être retrouvés. (198).

Le myélogramme est de richesse normale ou diminuée, infiltré par un clone tumoral constitué de cellules B présentant un continuum de différenciation allant du lymphocyte au plasmocyte en passant par les cellules lymphoplasmocytaires (figure 44C et 44D). Les mastocytes sont augmentés dans 26% des cas (figure 44B) (200).

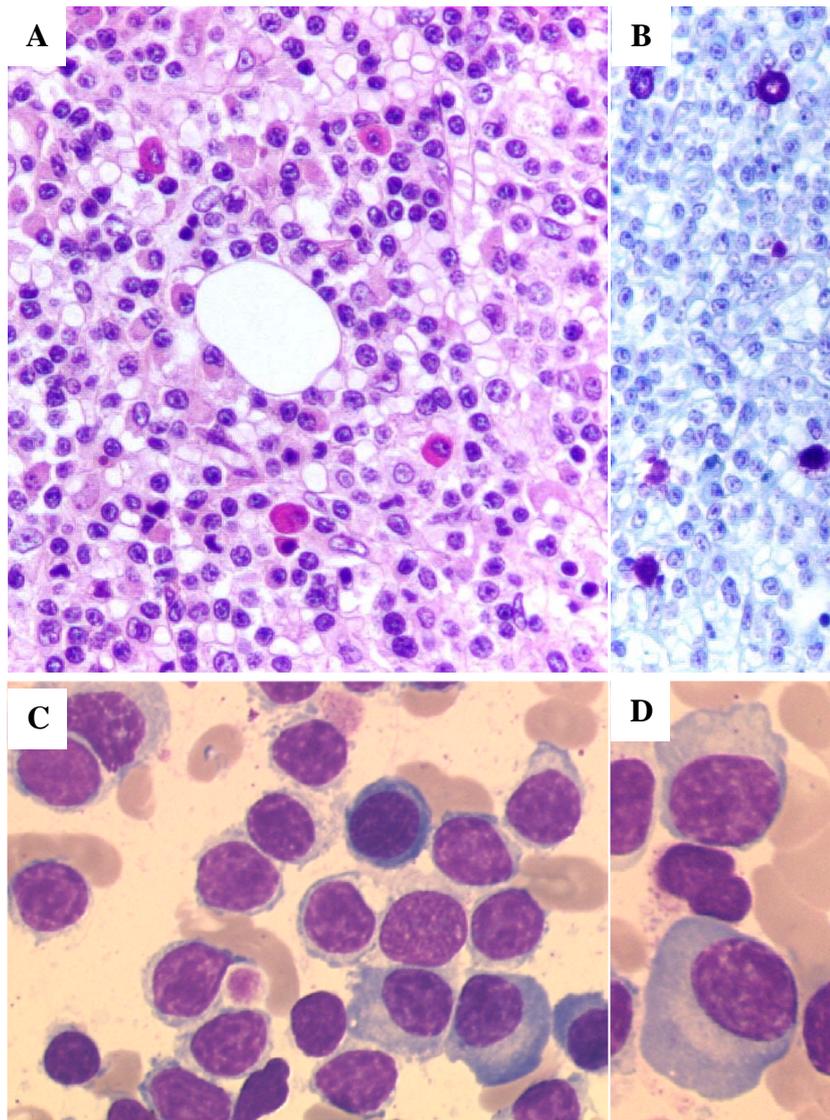


Figure 44 : biopsie ostéomédullaire de LPL/WM

Infiltrat lymphoplasmocytaire (A), augmentation de la population mastocytaire mis en évidence à la coloration de Giemsa (B)

Frottis médullaire : infiltrat lymphoplasmocytaire (C) constitué de lymphoplasmocytes et de plasmocytes (D).

Source : photographies non publiées de M. Parrens et F. Trimoreau

Atteintes extra-médullaires

Dans la plupart des cas de maladie de Waldenström avec atteinte ganglionnaire, les ganglions atteints ont conservé une architecture normale associée à des sinus dilatés avec parfois une persistance de quelques centres germinatifs résiduels. Cytologiquement, la prolifération est constituée d'une population monomorphe de petits lymphocytes, de cellules plasmocytaires et de lymphocytes lymphoplasmocytaires.

Dans la rate, l'infiltration est localisée dans la pulpe rouge sous forme de petits nodules composés d'une population lymphoplasmocytaire.

Immunophénotype et Immunohistochimie

Les cellules B expriment habituellement une IgM de surface, parfois une IgG, rarement une IgA et les chaînes légères sont monotypiques. Elles expriment les marqueurs pan-B (CD19, CD20, CD22 et CD79A), le score de Matutes est inférieur à 3. Les cellules B sont positives pour le FMC7. Classiquement les cellules sont négatives pour le CD5, le CD10, le CD103 et le CD23. Le CD25 et le CD38 sont fréquemment positifs. Il existe des atypies phénotypiques avec certains de ces marqueurs. Le CD5 et le CD23 peuvent être positifs avec une faible intensité avec des pourcentages de positivité allant de 5 à 20% pour le CD5 et de 1 à 61% pour le CD23 selon les séries (202). Le reste du phénotype n'est cependant pas compatible avec celui d'une LLC ou d'un autre syndrome lymphoprolifératif dans ce cas. Le CD10 est décrit positif dans 16% des cas mais cette positivité est associée à un marquage Bcl6 négatif. Les deux composantes lymphocytaire ou plasmocytaire expriment Pax5. Les cellules plasmocytaires expriment une IgM intracytoplasmique de même isotype, le CD138 et le CD13 (198).

Cytogénétique et anomalies moléculaires

En cytogénétique conventionnelle, jusqu'en 2007, le pourcentage d'anomalies chromosomiques avoisinait 30% dans le meilleur des cas, en raison du faible indice mitotique de cette pathologie. L'utilisation d'un oligonucléotide CpG associé à l'IL2 (203) a amélioré l'informativité de la technique standard avec un pourcentage de caryotype clonal de 47% dans la dernière étude.

Le caryotype est complexe dans environ 30% des cas, l'analyse en CGH-array montre que le nombre moyen d'anomalies de gain ou de perte est de trois avec une médiane à 7. Les translocations sont présentes dans 33% des cas mais celles impliquant l'IGH sont rares, <3%.

L'anomalie la plus fréquente dans les LPL/WM est la délétion du bras long du chromosome 6, de 31 à 54% selon les séries. Même si l'incidence de cette anomalie est la plus élevée parmi les lymphopathies B, elle n'est pas spécifique. On retrouve des délétions du

6q dans 6% des LLC, dans les lymphomes de la zone marginale notamment dans 21% des lymphomes du MALT et dans le myélome multiple (167, 204, 205). Il existe 4 zones minimales de délétion sur le bras long du chromosome 6, en 6q16, en 6q21 en 6q 23-24.3 et en 6q25-26. Les 2 principales régions contiennent toutes deux un gène suppresseur de tumeur, *BLIMP-1* ou *PRDM1* en 6q21 et A20 ou TNFAIP3 en 6q23, qui pourraient être impliqués dans la physiopathologie de ce lymphome (206, 207). BLIMP1 est un suppresseur de la prolifération cellulaire, il régule aussi négativement PAX5. L'inactivation de A20 entraîne une activation constitutive de la voie NF- κ B. La délétion du 6q a un pronostic controversé car elle est associée à des caryotypes complexes, une hypoalbuminémie et une β 2 microglobuline élevée mais n'a pas d'impact sur la progression ni la survie (208). Les études de CGH-array ont montré que dans 17% des cas, il existe un gain du 6p qui survient systématiquement après la perte en 6q, comme un évènement secondaire (206).

Une trisomie 4 est retrouvée dans 10 à 20% des cas, parfois isolément, même en cas de LPL non IgM. Elle semble être l'anomalie récurrente la plus spécifique. Elle n'est pas décrite dans les lymphomes de la zone marginale. Cette trisomie est associée à un taux élevé d'IgM, de CRP et de β 2 microglobuline mais n'a pas d'impact connu sur l'évolution de la maladie. Elle jouerait un rôle dans la susceptibilité intrafamiliale de la maladie de Waldenström, car un déséquilibre de liaison a été décrit dans la région 4q33-q34 (209).

D'autres anomalies, classiquement décrites dans les lymphomes de la zone marginale, sont également présentes : la trisomie 3, la trisomie 18 ainsi que la délétion 7q.

On retrouve également des anomalies décrites classiquement dans la LLC : une délétion du 11q22 impliquant ATM dans 8% des cas, une trisomie 12 dans 3% des cas. La délétion du 13q14, décrite dans 50% des LLC et dans le myélome multiple (MM), est retrouvée dans 10% des cas de LPL/WM par CGH array (206). La région minimale de délétion est comparable à celle des LLC et des lymphomes spléniques mais différente de celle du MM. elle contient 2 micro-ARN, *miRNA-15a* et *miRNA-16-1*, qui régulent négativement Bcl2 et jouent ainsi un rôle d'inhibiteur de protéines anti-apoptotiques (210).

La délétion du 17p, impliquant TP53 est observée dans 5 à 10% des cas, elle est associée à une progression de la maladie avec une survie sans progression plus courte.

Le statut mutationnel des *IGHV*

Un réarrangement VDJ pour la chaîne lourde des Ig est détecté dans 90% des cas de Waldenström.

Cinq séries ont été rapportées comportant de 7 à 52 cas. Les cas sont en majorité mutés pour *IGHV* avec des taux généralement supérieurs à 5%. Il existe également des cas non mutés ayant une parfaite homologie avec la séquence sauvage (211-213). Ils représentent environ 4% des cas.

Il existe une surreprésentation de la famille *IGHV3* (75% des cas) avec notamment une fréquence d'*IGHV3-23*. La région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines est communément mutée (213). La diversité intra-clonale n'est pas décrite dans cette pathologie (211). Bien que la région switch de l'IgH soit fonctionnelle, les cellules sont de type IgM et n'ont pas subi la commutation isotypique (214, 215).

Chapitre 4 : Objectifs du travail

Ce travail a consisté en l'étude du réarrangement génique de la chaîne lourde de l'immunoglobuline des lymphomes de la zone marginale et du LPL/WM. Les objectifs de cette étude étaient :

- (i) d'établir un répertoire de gènes utilisés pour chaque sous-groupe de lymphomes B indolents et de faire des comparaisons avec le répertoire normal
- (ii) d'établir un profil d'hypermutation somatique pour chaque entité afin d'appréhender le compartiment d'origine de la cellule tumorale,
- (iii) d'évaluer la distribution des mutations et de voir l'impact d'une sélection antigénique sur ce processus d'hypermutation
- (iv) rechercher la présence d'un éventuel épitope antigénique commun par l'étude de la zone de jonction du réarrangement (HCDR3).

Le but de cette étude était de réaliser des comparaisons entre les différents types de lymphomes. Le travail a été effectué en deux étapes.

Dans un premier temps, nous avons comparé les SMZL aux LPL/WM. L'objectif était de confirmer l'hypothèse qu'il s'agit bien de deux lymphomes distincts provenant de deux compartiments cellulaires ayant des expositions à l'antigène différentes.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué la comparaison entre les SMZL, NMZL, lymphomes du MALT et LPL/WM associée à la recherche de la mutation MYD88 L265P. L'objectif de ce deuxième travail était de rechercher les relations et/ou les différences entre ces entités afin de confirmer ou d'infirmer leur existence et dégager des critères spécifiques pour chacune d'entre elles.

***Chapitre 5 : Méthodologie utilisée
pour l'analyse des séquences IGHV
humaines***

L'étude des réarrangements *IGHV* chez l'homme est délicate. En effet, comme indiqué dans l'introduction, il y a théoriquement 6300 combinaisons VDJ possibles, chaque segment pouvant présenter un polymorphisme parfois important comme *IGHV1-69* avec 13 allèles différents et *IGHV3-30* avec 19 allèles différents. La technique repose sur la combinaison de PCR simplex et multiplex suivi d'un séquençage direct. Par la technique que nous utilisons, les variants minoritaires en rapport avec la diversité intraclonale ne sont pas vus. L'étude des gènes *IGHV* chez l'humain impose la plus grande rigueur à toutes les étapes, extraction d'acide nucléique, réalisation des amplifications géniques et du séquençage, interprétation des séquences. La complexité de l'analyse a pour cause principale les mutations somatiques sur les régions variables, altérant significativement la séquence germinale. L'utilisation d'outils bioinformatiques à disposition sur Internet et constamment actualisés facilite cette analyse, et le site de MP Lefranc est la référence universellement reconnue. Néanmoins, nous avons été conduits également à développer nos outils que nous présentons.

Extraction des acides nucléiques

Un broyage des tumeurs est effectué avec le Tissuelyser (QIAGEN™) et 3 billes inox de 3 mm. Une extraction d'ADN est réalisée avec le kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN™). L'ADN extrait est qualifié au Nanodrop® et par amplification du gène de ménage *MSH2* (amplificabilité de l'ADN). Une extraction d'ARN est réalisée dans les cas suivants :

- lorsque deux séquences fonctionnelles sont retrouvées sur l'ADN,
- lorsqu'il existe deux pics clonaux trop proches pour être séparés,
- quand aucune séquence fonctionnelle n'est retrouvée,
- quand la séquence fonctionnelle identifiée sur l'ADN comporte une anomalie inhabituelle : délétion de plus de 3 bases, délétion ou insertion en dehors de zones flanquantes des CDR1 ou 2.

En cas d'extraction d'ARN, nous utilisons le même protocole de broyage et le kit d'extraction RNeasy mini kit (QIAGEN™). L'ARN est qualifié au Nanodrop® et par un profil Agilent®. Un cDNA est synthétisé avec le kit Superscript II® (Invitrogen™) puis validé par une amplification d'un gène de ménage (*Abl*).

Amplification

L'amplification des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines est réalisée selon deux stratégies techniques : l'une avec des amorces publiées (Biomed 2), l'autre avec des amorces conçues par nous.

En première intention, nous réalisons des PCR ou RT-PCR multiplexes selon le protocole européen Biomed 2 (9) avec des amorces sens positionnées dans les régions Framework (FR) 1 et 2 des domaines variables des *IGHV* et une amorce antisens consensus des *IGHJ* (JHc) :

Ces amplifications à partir d'amorces publiées sont réalisées en deux temps en fonction de la fréquence attendue des différents sous-groupes de gènes *IGHV*.

Les premières amplifications sont réalisées avec les amorces permettant une amplification des segments *IGHV* les plus fréquents dans le répertoire normal. Dans la publication initiale de Biomed 2, les PCR sont réalisées en multiplex, nous utilisons également des PCR simplex ne comportant qu'une seule amorce dans la région variable pour réaliser plus facilement un séquençage direct après amplification :

- FR1 multiplex associées aux PCR simplex VH1-FR1/JHC, VH3-FR1/JHc, VH4-FR1/JHc.
- FR2 multiplex associées aux PCR simplex VH1-FR2/JHC, VH3-FR2/JHc, VH4-FR2/JHc

Si les amorces sont informatives (obtention d'un clone) avec l'un des jeux simplex, la technique est poursuivie par un séquençage. Dans le cas contraire (PCR multiplex informative mais PCR simplex négative ou faiblement polyclonale), nous poursuivons les amplifications avec d'autres amorces pour amplifier les segments *IGHV* les moins fréquents du répertoire normal :

- PCR simplex VH2-FR1/JHc, VH5-FR1/JHc et VH6-FR1/JHc
- PCR simplex VH2-FR1/JHc, VH5-FR1/JHc, VH6-FR1/JHc, VH7-FR2/JHc

En deuxième intention, nous utilisons des amorces que nous avons conçues, localisées dans l'exon 1 (LPART 1) de la séquence leader en 5' des gènes *IGHV*. Ces régions leader sont en principe épargnées par le processus d'hypermutation somatique et sont préservées quelque soit le nombre de passage du lymphocyte dans le centre germinatif. Nous avons conçu un jeu complet d'amorces situées dans la région LPART 1 du leader de chaque *IGHV* connu. Ces amorces sont utilisables en multiplex aussi bien en PCR standard qu'en PCR de séquençage. Elles nous permettent d'avoir la totalité de la région *IGHV* à disposition pour un séquençage. Les cas résolus par cette deuxième technique d'amplification sont :

- ceux présentant un taux de mutations élevé avec pour conséquence une mauvaise hybridation Biomed 2 dans les régions Framework
- ceux étant non informatifs avec les amorces de Biomed 2
- ceux ayant aboutissant à une seule séquence *IGHV* non fonctionnelle ne pouvant produire de protéine.
- ceux donnant une séquence fonctionnelle mais avec un taux de mutations somatiques situé dans une zone difficile à interpréter entre 2 et 3%.

En pratique, la combinaison des PCR Biomed 2 et V Leader sur ADN et Biomed 2 sur ARN permet de solutionner presque tous les cas.

Séquençage

Le principe du séquençage direct à l'issue de l'amplification a été délibérément choisi. Cette technique présente une sensibilité médiocre (10 à 20% selon les cibles). Aussi ne sont visualisées que les espèces majoritaires après amplification. Les prélèvements biopsiques extraits contiennent d'autres cellules que la population tumorale d'intérêt. La faible sensibilité du séquençage direct est ici exploitée car un résultat informatif n'est obtenu qu'en cas de prélèvements suffisamment infiltrés.

Après amplification, nous réalisons une migration en électrophorèse capillaire (ABI PRISM 3130, Applied Biosystem™). L'analyse des profils de clonalité obtenus est réalisée par le logiciel Genemapper Applied™. Les produits d'amplification sont purifiés, à partir d'une électrophorèse en gel d'agarose 2%, avec le kit DyeEX (QIAGEN™). Nous réalisons ensuite un séquençage direct à partir des mêmes amorces dans les deux sens selon la méthode

de Sanger adaptée à l'utilisation de la fluorescence (216). L'analyse des produits de séquençage s'effectue sur les séquenceurs 3130 XL Applied™ à 16 capillaires. L'analyse en FR2 associée à FR1 permet de vérifier la concordance des résultats en termes de segments géniques identifiés et pour une partie en termes de profil de mutations somatiques.

Analyse de séquences

Les bases de données

Il existe 3 principales bases de données dédiées à l'étude des gènes des immunoglobulines

- IMGT : IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®
http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanlg
- IgBlast : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>
- V-BASE : http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN_position=1:1

Les trois bases sont globalement identiques. Lorsqu'il existe des discordances, elles sont dues à la différence d'exhaustivité et de systèmes d'annotation et de définition des segments FR et CDR.

VBASE est un répertoire de séquences germinales humaines d'immunoglobuline compilées à partir de Genbank et EMBL. Il utilise les critères structuraux des gènes des immunoglobulines définis par Chothia (217-219) ainsi que les CDR sont définis par la base de données de séquences d'anticorps Kabat (220). La base de données était mise à jour par le Centre d'Ingénierie des Protéines de l'Université de Cambridge, la mise à jour a cessé depuis décembre 2007.

IgBlast est un système dérivé directement de Blast, l'algorithme universellement utilisé pour les alignements de séquences. Il aligne les séquences obtenus à partir d'une collection de séquences germinales V, D et J des loci des chaînes lourdes et légères : par exemple, la collection provient à la base des travaux de l'équipe d'Honjo (221) pour les *IGHV* ou de trois travaux différents pour les *IGKV* (222-224). En aout 2007, IgBlast a intégré dans sa base, les séquences germinales d'IMGT®.

IMGT® tient la place la plus importante dans l'analyse des séquences génétiques des gènes des immunoglobulines. L'équipe de Marie-Paule Lefranc de l'université de Montpellier a mis en place une nomenclature internationale pour les gènes des immunoglobulines en créant en 1989 une base de données internationale, IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® avec un accès internet dès 1995 (<http://www.imgt.org>) (225). Aujourd'hui c'est la référence internationale en immunogénétique et immunoinformatique car IMGT® est spécialisé dans les séquences, structures et données génétiques des IG, TR, CMH des vertébrés, des protéines des superfamilles IgSF et MhcSF et du système immunitaire (SI). IMGT® comprend six bases de données, des ressources Web (plus de 10.000 pages HTML) et quinze outils interactifs (IMGT/V-QUEST (226), IMGT/JunctionAnalysis, etc). Grâce à l'alignement de nombreuses séquences et aux données de diffraction des rayons X (227), la caractérisation des boucles hypervariables (228), l'équipe a crée des références uniques pour les différents gènes en précisant les noms, les allèles, les positions des différentes régions comme les CDR et FR dans les gènes variables à partir de positions hautement conservées comme les positions des acides aminés impliqués dans les ponts disulfures inter ou intra-caténares (10). Ainsi le CDR3 est défini par rapport aux positions 105 à 116 en acides aminés et comporte de 2 à 13 acides aminés si l'on considère les séquences en configuration germinale. Le système d'annotation d'IMGT® est facile à comprendre car il est toujours relié avec une représentation structurée des annotations (10). Par exemple, un exon IGHV est défini par la séquence d'ADN germinale depuis le deuxième exon de la séquence leader (LPART2) jusqu'à la fin de la région codante V. Cette dernière s'arrête au premier nucléotide de l'heptamère (figure 45).

"DESCRIPTION"

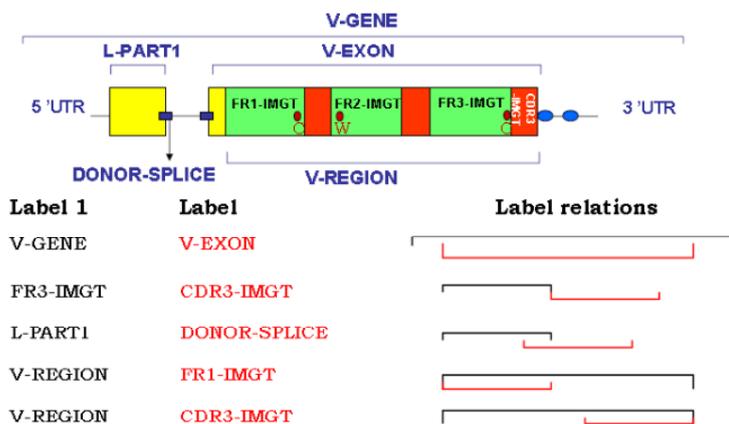


Figure 45 : annotation d'une région variable selon IMGT

Source : d'après une présentation de V. Guidicelli (229)

Egalement IMGT® est la base la plus complète en termes de polymorphismes et d'allèles. Ses mises à jour sont régulières : la dernière mise à jour a été réalisée le 12 décembre 2012, le jour de ma consultation du site.

Méthodologie d'analyse

Les séquences obtenues sont analysées dans notre base locale ainsi que dans 3 bases de données internationales :

- IMGT : IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®
http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanlg
- IgBlast : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>
- V-BASE : http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN_position=1:1

Dans le détail, l'identification complète des 3 gènes *IGHV*, *IGHD* et *IGHJ* du réarrangement de la chaîne lourde de l'immunoglobuline est réalisée avec l'outil d'analyse IMGT/V-QUEST (226, 230). L'analyse de la jonction et du segment HCDR3 utilise l'outil IMGT/Junction Analysis tool (231). La base de référence est celle d'IMGT. Les deux autres bases sont utilisées afin de vérifier la concordance des résultats mais en appliquant toujours la nomenclature de IMGT®. Pour cela, les données collectées dans IMGT, Ig Blast et V-BASE sont intégrées dans notre propre base de données dans laquelle nous avons développé notre outil personnalisé de vérification de concordance.

Lorsqu'il existe une différence entre les 3 résultats fournis dans les bases, nous cherchons à les comprendre afin de maîtriser le rendu du résultat et d'augmenter notre expertise.

Dès le départ du projet, IMGT® disposait de la base la plus complète. Comme d'autres équipes (232, 233), nous avons remarqué que les discordances entre les trois bases provenaient surtout d'une différence d'informativité allélique ou de délimitation des segments IGHV. A la mise en place de notre procédure, nous avons donc considéré que les résultats

d'IMGT® constituait notre 1^{ère} base de travail d'analyse lorsque la séquence était identifiée et validée (identification de la séquence germinale et séquence testée productive).

La base Igblast est utilisée lorsque la séquence testée ne contient pas strictement la séquence du réarrangement VDJ. Parfois l'amplification *IGHV* est obtenue à partir d'une hybridation non strictement homologue des amorces. De plus, les mutations somatiques des régions variables *IGHV* peuvent modifier l'affinité de la séquence VDJ pour une amorce. Ainsi, l'amorce peut parfois s'hybrider sur un *IGHV* immédiatement adjacent au réarrangement VDJ productif. Le produit PCR obtenu est de taille supérieure à la taille attendue, il y a alors un segment intronique dans la séquence testée. IgBlast étant basé sur l'algorithme d'alignement de séquence Blast permet d'identifier les segments VDJ malgré la présence de séquences inattendues ou non identifiées.

La base VBase est utilisée lorsque la séquence n'est pas productive. Le logiciel permet de mieux comprendre où se situe le problème lors de situations complexes, notamment lorsqu'il ne s'agit pas simplement de la présence d'un codon stop dans la région *IGHV*.

A partir des solutions proposées par Ig Blast et Vbase, nous reconstruisons un VDJ virtuel annoté tel que requis par IMGT, que nous soumettons à IMGT pour identification des gènes.

Pour les cas non complètement résolus dans IMGT®, une analyse indépendante des données s'est avérée nécessaire. Nous avons donc développé une méthodologie interne au laboratoire avec des outils d'analyse locaux permettant de regrouper les informations obtenues par les trois bases, de construire un répertoire local de séquences germinales *IGHV*, de réaliser des alignements et des calculs qui n'étaient pas fournis par les bases au départ du projet. Cette méthodologie locale développée à partir 2005 est toujours utilisée bien qu'IMGT® ait évolué au cours du temps. Les évolutions d'IMGT majeures ont toutefois été appliquées à nos séquences. Ceci nous a conduits à systématiquement réanalyser nos séquences avec la dernière version de la base IMGT avant publication de nos résultats. Cette réanalyse est très importante à faire car elle a changé l'affectation des gènes V, D ou J dans 10% des cas lors de la dernière réanalyse.

Nos outils locaux sont développés sous Excel. Nous disposons d'un fichier Excel pour chaque séquence qui compile l'ensemble des données utiles à l'analyse et réalise des tâches automatiques dans les différents onglets:

- un onglet est dédié à l'homologie avec la séquence germinale identifiée par IMGT déduite automatiquement des amorces. Le fichier effectue un alignement de séquence en acides nucléiques avec notre répertoire de séquences germinale, positionne l'amorce utilisée pour la séquence, les CDR1, 2 et 3, calcule un pourcentage d'homologie à partir de la séquence déduite de l'amorce, compare le calcul d'homologie obtenu avec le résultat proposé par IMGT.
- Dans un autre onglet, l'alignement en acides aminés est réalisé afin de voir les erreurs de cadre de lecture. A cette étape, les mutations remplaçantes (R) et silencieuses (S) sont positionnées le nombre total des mutations R et S est calculé ainsi que le nombre de R et de S dans les CDR et les FR.
- Un onglet est dédié à la zone jonctionnelle selon les critères d'IMGT. Cet onglet permet de collecter toutes les données fournies par IMGT. Il permet d'individualiser la séquence jonctionnelle en nucléotides et acides aminés, visualiser les différents segments codants, la N diversité, la P diversité, de calculer les tailles de CDR3 en nucléotides et acides aminés, ainsi qu'identifier les principales caractéristiques physico-chimiques des acides aminés impliquées dans la zone de jonction selon des critères standardisés par l'équipe de Marie-Paule Lefranc (nombre de d'acides amines aliphatiques, acides, basiques, chargés, etc..) (234).
- Un onglet est dédié au calcul de pression de sélection. Il fournit la séquence germinale correspondant à la région séquencée déduite de l'amorce, les premières positions des différents segments FR et CDR et le nombre de mutations R et S dans chaque segment.

L'analyse de la pression de sélection antigénique est réalisée avec un logiciel développé par notre ingénieur bioinformatique, M. Abdel Marfak, le logiciel MutAnalysis. Il permet de réaliser des études statistiques utilisant au choix le modèle binomial de Chang et Casali (235) et le modèle multinomial de Lossos (236), en incluant ou non le CDR3. Globalement le calcul statistique consiste à déterminer si la distribution des mutations entre les CDR et les FR est différente d'une distribution aléatoire. Une p-value significative ($p < 0,05$) est interprétée comme l'existence d'une pression de sélection par un antigène.

Chapitre 6 : Les articles de la thèse

Publication N°1 : Splenic marginal zone lymphomas and lymphoplasmacytic lymphomas originate from B-cell compartments with two antigen exposure histories (2008)

Contexte

Ce travail est antérieur à l'édition 2008 de la classification OMS. Les critères recommandés pour le diagnostic des ZML et LPL/WM sont ceux de la classification OMS 2001.

Dans la classification OMS 2001, le LPL/WM est considéré comme une entité distincte, la maladie de Waldenström n'est pas encore spécifiée. Avant 2008, le diagnostic de LPL/WM est basé sur 3 critères non spécifiques : la morphologie, le phénotype et la présence d'un pic IgM monoclonal. La morphologie est celle de cellules lymphoplasmocytaires sans les caractéristiques d'autres lymphomes indolents (LLC, FCL, MCL, etc...) Le phénotype montre une monotypie B avec l'absence de marqueur CD5, CD10 et CD23. Le taux minimal du pic IgM n'est pas précisé même si le seuil de 3g/L est cité pour la maladie de Waldenström. Les auteurs soulignent cependant que d'autres lymphomes peuvent être accompagnés d'un pic monoclonal IgM et qu'il faut éliminer de ce type les lymphomes B indolents qui présentent des caractéristiques lymphoplasmocytaires comme cela peut être le cas dans la LLC, le FCL et les ZML. Rien n'est encore précisé sur la difficulté du diagnostic différentiel dans les ZML.

Ainsi, avant la classification OMS 2008, le LPL/WM est déjà considéré comme un lymphome B indolent CD5- distinct mais son diagnostic était surtout un diagnostic morphologique d'exclusion. La différenciation plasmocytaire pouvait être considérée comme une variation morphologique et le pic monoclonal IgM, comme un syndrome clinique. Si bien que certains auteurs se posaient la question de l'existence de cette entité (237).

Le LPL/WM apparait clairement distinct du myélome multiple. Ce dernier se présente avec un tableau clinique différent de part ses lésions ostéolytiques, un immunophénotype de

type plasmocytaire seul, un profil cytogénétique spécifique avec notamment des translocations impliquant IgH fréquentes.

De même dans la plupart des cas, il est aisé de différencier le LPL/WM des autres lymphomes B que sont la LLC, le FCL et le MCL même lorsque ces derniers présentent une différenciation plasmocytaire ou un pic IgM. Ces lymphomes présentent un immunophénotype, une morphologie et une cytologie qui leur est propre. La LLC ou le lymphome lymphocytaire présentent des cellules tumorales de type petits lymphocytes B matures. L'immunophénotype est caractéristique avec un CD5 positif, des chaînes légères avec une faible intensité. Le score de Matutes permet de classer la LLC parmi les autres lymphomes B indolents. Le MCL est typiquement caractérisé par des lymphocytes à noyaux encochés nucléolés exprimant le CD5. Le FCL en phase leucémique comporte une population homogène de petits lymphocytes clivés avec un phénotype CD10+.

C'est avec les lymphomes de la zone marginale que le LPL/WM est le plus proche car il partage des caractéristiques morphologiques et phénotypiques. Ainsi il est difficile de faire la distinction entre LPL et ZML dans deux types de situations : lorsque les lymphomes de la zone marginale présentent une différenciation plasmocytaire (238, 239) ou lorsque le LPL présente une localisation extra-médullaire. La classification OMS 2001 évoque le problème des lymphomes lymphoplasmocytaires à localisation extra-ganglionnaire et recommande de les classer plutôt en lymphome du MALT (240). Mais dans tous les autres cas, les cellules tumorales sont des lymphocytes, des cellules lymphoplasmocytaires et des plasmocytes avec un phénotype commun IgM+, CD19+, CD20+, CD5-, CD23- et sans aucun marqueur spécifique. Ce chevauchement de critères immuno-morphologiques entre LPL/WM et ZML posait la question de l'existence des 2 entités. Le LPL/WM pouvait être considéré comme :

(i) soit un sous-type clinique ou un variant morphologique d'une même entité : un lymphome de la zone marginale avec une différenciation plasmocytaire marquée

(ii) soit une entité particulière devant une atteinte médullaire primitive majeure associée à un envahissement splénique ou ganglionnaire.

L'analyse de l'*IGHV* du clone tumoral fournissant des informations sur l'origine de la cellule clonale et son parcours dans l'immunopoïèse B jusqu'au stade tumoral pouvait contribuer à éclaircir cette problématique.

Question posée

Le but de ce travail était de clarifier les relations entre les lymphomes de la zone marginale splénique et les lymphomes lymphoplasmocytaires par l'analyse génétique du réarrangement VDJ de la chaîne lourde des Ig à partir d'un même compartiment biologique. Les lymphomes spléniques ont une infiltration médullaire fréquente, les lymphomes lymphoplasmocytaires une infiltration quasi constante. Dans ces conditions, une analyse génétique *IGHV* sur un prélèvement médullaire infiltré permettait d'avoir des résultats directement comparables afin de dégager l'existence de similarité ou non.

Résumé

L'étude a porté sur 11 cas de SMZL et 14 cas de LPL, tous infiltrés dans la moelle et pour lesquels on disposait d'ADN de biopsie ostéomédullaire. L'analyse *IGHV* a montré une répartition des *IGHV* différente entre les SMZL et les LPL : les *IGHV* retrouvés dans les SMZL étant dispersés dans les familles V1, V3 et V4, les *IGHV* des LPL étant principalement des V3 avec une prédominance d'*IGHV3-23*. La comparaison avec le répertoire des cellules B normales montrait une surreprésentation des *IGHV1* pour les SMZL et des *IGHV3* pour les LPL. Les profils mutationnels étaient également différents entre les deux entités car les cas de LPL présentaient un taux globalement supérieur à celui des SMZL et une distribution des mutations compatible avec une pression de sélection positive selon le modèle multinomial de Lossos. L'analyse des HCDR3 a montré une différence significative en taille entre les 2 groupes, les HCDR3 des SMZL étant plus longs que ceux des LPL. Cette augmentation de la taille était due à l'introduction de N-nucléotides riches en GC, classiquement introduit par la Terminal deoxyribonucleotide Transferase.

Publication N°2 : *IGHV* gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström Macroglobulinemia / lymphoplasmacytic lymphomas

Contexte

Même si la classification OMS 2008 a permis de définir les caractéristiques majeures de chaque sous-type de ZML et des LPL/WM, leur caractérisation est toujours imparfaite en 2012.

Le NMZL constitue l'entité la plus rare, pour laquelle le nombre de cas étudiés est limité dans chaque série (142, 149, 195-197, 241, 242). Le diagnostic de ce type de ZML est le plus difficile. Il est basé sur trois critères principaux :

- (i) la présentation clinique avec une absence d'infiltration splénique ou extra-ganglionnaire de type MALT,
- (ii) la morphologie de l'infiltration tumorale : typiquement on note avec une hyperplasie de la zone marginale des ganglions due à un envahissement par des cellules de type zone marginale et
- (iii) l'exclusion des autres types de lymphomes.

En pratique, il existe deux grandes difficultés diagnostiques. La première correspond à la fréquence des stades avancés de la maladie avec un stade III-IV dans 41 à 82% des cas (243). Certes, par définition, le lymphome est localisé dans les ganglions mais la majorité des patients présentent une maladie disséminée avec une atteinte ganglionnaire non isolée associant une infiltration médullaire dans 50% de cas et une atteinte splénique dans 20% des cas. La deuxième difficulté diagnostique est purement morphologique. Elle est due à l'hétérogénéité de la population cellulaire tumorale, décrite dans environ 70% des cas (244). Les types cellulaires varient du petit lymphocyte à la grande cellule immunoblastique. Il existe notamment des cellules comportant une différenciation plasmocytaire. Cette caractéristique lymphoplasmocytaire, décrite dans environ 60% des cas (183), est commune et pose toujours actuellement le problème du diagnostic différentiel avec le LPL/WM (244).

Les cellules tumorales peuvent détourner les voies de signalisation d'un lymphocyte B normal afin d'assurer leur survie et leur prolifération. Ceci passe par des mutations génétiques qui entraînent soit un gain de fonction des activateurs de signalisation soit des pertes de

fonction des régulateurs négatifs. De nombreux évènements oncogéniques convergent vers la voie anti-apoptotique NF-kappa B. Récemment Staudt et collaborateurs ont montré par screening d'ARN interférant qu'une voie de signalisation de l'immunité innée était impliquée dans la physiopathologie des lymphomes, notamment des lymphomes B diffus à grandes cellules de type ABC et que MYD88 était la cible de mutations oncogéniques (245).

MYD88 intervient en amont de la voie de signalisation de NF-kappa B. C'est une protéine adaptatrice, capable de coupler les protéines à motif TIR comme les TLR (Toll Like Receptor) à toute une variété de voies de signalisation cellulaire comme la voie NF-kappa B, la voie P38 MAP kinase ou la voie de l'interféron de type I (246). Sollicitée dès la fixation d'un ligand sur un TLR, Myd88 assure la phosphorylation et l'activation des IRAK, protéines suivantes dans la cascade de signalisation pour activer in fine NF-kappa B. Les mutations de *MYD88* sont activatrices conférant un avantage de prolifération par activation continue des protéines IRAK. La protéine comporte 3 domaines mais les mutations sont localisées dans le domaine TIR uniquement (figure 46). La mutation L265P est prédominante en termes de fréquence (29% dans les DLBCL de type activé, ABC et 9% dans les lymphomes du MALT). Cette mutation touche un acide aminé particulièrement conservé dans l'évolution, situé dans un feuillet bêta du noyau hydrophobique du domaine TIR, région importante pour la fixation aux protéines (247). *MYD88* a été étudié dans les LPL/MW par l'équipe de Treon (248, 249).

Ce gène est fréquemment muté dans ce type de lymphome ce qui rend la recherche des mutations de *MYD88* très pertinente dans les NMZL où le diagnostic différentiel avec les LPL/MW se pose. Dans les SMZL, les mutations de *MYD88* ont été évaluées à 13% dans une série de 34 cas avec une majorité de mutation L265P (250).

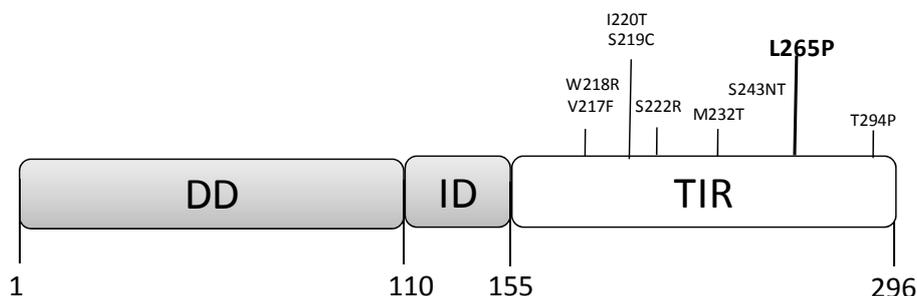


Figure 46 : représentation schématique de la protéine Myd88 et ses mutations actrices
DD : Death domaine, ID : domaine intermédiaire, TIR : domaine Toll/Interleukine 1 receptr

Question posée

Nous nous sommes proposés dans ce travail d'étudier les séquences *IGHV* et de rechercher la mutation L265P de *MYD88* dans une série de MZL et LPL/WM dans le but de dégager des caractéristiques génétiques pour chaque lymphome et de mieux délimiter chacune des entités.

Résumé

L'étude a porté sur une série de 123 patients comportant 53 cas de SMZL, 11 cas de NMZL, 28 cas de lymphome du MALT et 31 cas de LPL/WM. Le matériel tumoral dédié à l'analyse génétique correspondait au territoire d'infiltration initial de la maladie : la rate pour les SMZL, un ganglion pour les NMZL, l'atteinte extra-ganglionnaire pour les lymphomes du MALT et la moelle ou un ganglion pour les LPL/WM. Le diagnostic de chaque lymphome a été posé selon les critères de la classification OMS 2008. L'analyse *IGHV* a été réalisée par PCR et séquençage direct afin d'étudier le répertoire de gènes *IGHV*, *IGHD* et *IGHJ* utilisés, de rechercher la présence de motifs canoniques décrits dans la littérature, d'évaluer le statut mutationnel du segment *IGHV* avec un seuil à 2% et d'étudier la séquence CDR3. Une étude de pression de sélection par le modèle multinomial de Lossos a été réalisée pour les cas présentant des mutations somatiques. La recherche de la mutation L265P de *MYD88* a été réalisée par PCR RFLP : une PCR sur ADN génomique tumoral permettant d'amplifier l'exon 5 de *MYD88* suivie d'une digestion par l'enzyme de restriction BsiE1, comportant le site de restriction CGRY↓CG. Le site de restriction est présent en cas de mutation *MYD88* L265P.

Dans les SMZL, l'*IGHV1-2* et la famille *IGHV4* ont été retrouvés dans 33% et 24% des cas respectivement. Parmi les séquences *IGHV1-2*, la moitié d'entre elles présentaient le motif canonique décrit dans la littérature. 35% des cas comportaient une séquence *IGHV* non mutée et 19% des cas présentaient une pression de sélection. Une séquence HCDR3 supérieure à 17 acides aminés est présente dans 75% des cas.

Dans les NMZL, la famille *IGHV3* est retrouvée dans 57% des cas, sans motif canonique connu. 75% des cas présentent un taux de mutations somatiques inférieur à 2% et une pression de sélection n'est identifiée que dans 27% des cas. La taille du HCDR3 était supérieure à 17 acides aminés dans 55% des cas. Dans les cas de lymphomes du MALT, la répartition des *IGHV* était hétérogène et aucun motif stéréotypé n'avait été identifié. Les cas

ne présentaient pas de mutations somatiques dans 28% des cas. 28% de cas retrouvaient une pression de sélection selon le modèle de Lossos. La taille du HCDR3 était supérieure à 17 acides aminés dans 43% des cas.

Pour les cas de LPL/WM, la famille *IGHV3* était identifiée dans 77% des cas avec un *IGHV3-23* et un *IGHV3-7* dans 35% et 29% des cas respectivement. Aucun motif canonique n'avait été mis en évidence. Le statut non muté n'a pas été retrouvé parmi les cas de LPL/WM. 90% des cas présentent une pression de sélection. La taille du HCDR3 était supérieure à 17 acides aminés dans 13% des cas.

La mutation *MYD88* L265P a été retrouvée dans 67% des cas de LPL/WM, dans 7% des cas de lymphomes du MALT et 4% des cas de SMZL. Aucun cas de NMZL ne présentait la mutation. Tous les cas mutés *MYD88* L265P comportaient un pic monoclonal à IgM. Parmi les cas présentant la mutation, 38% des cas comportaient un *IGHV3* dans leur réarrangement fonctionnel, 64% un *IGHV3-7* et 38% un *IGHV3-23*. 41% des cas mutés *MYD88* L265P présentaient un taux de mutations *IGHV* supérieur à 2% et 30% des cas un taux supérieur à 5%. Une pression de sélection a été retrouvée dans 39% des cas mutés *MYD88* L265P. 5% des cas mutés *MYD88* L265P comportaient une taille de HCDR3 supérieure à 17 acides aminés.

dans l'article, nous avons aussi comparé le répertoire *IGHV* des lymphomes de cette série à celui des cellules normales publiés par Crowe et al., pour lesquelles les résultats détaillés de l'analyse des séquences sont disponibles en ligne (82).

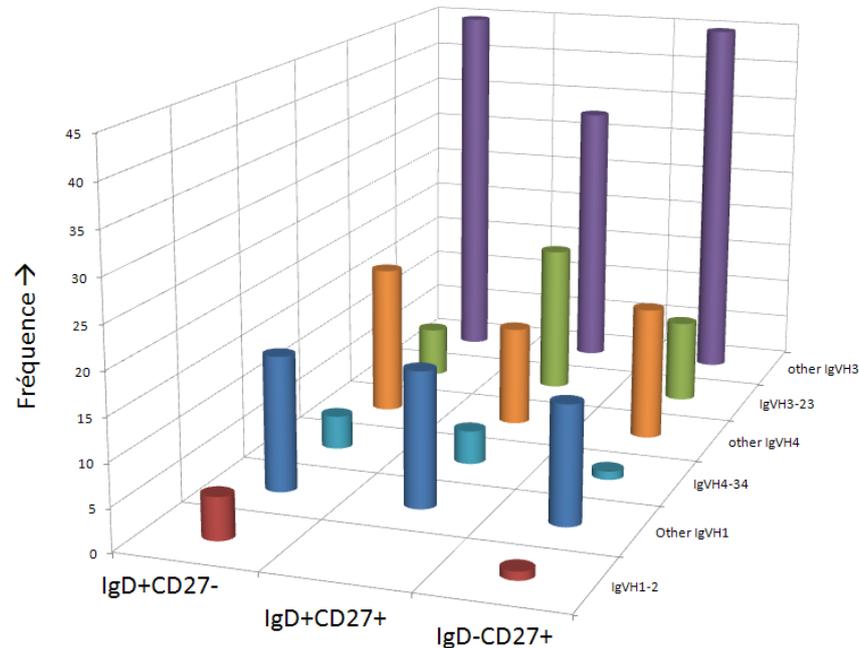


Figure 47 : fréquence de répartition des gènes *IGHV* selon le sous type lymphocytaire B.

Source : d'après les résultats publiés de Crowe et al. (82).

Dans les limites de la méthode, ceci montre que la surreprésentation des gènes *IGHV1-2* dans les SMZL ne correspond à aucun des 3 sous types lymphocytaires B étudié par le groupe de Crowe (82). Cette figure montre d'ailleurs que les remaniements du gène *IGHV1-2* est surtout présent dans les cellules B naïves. Le réarrangement *IGHV1-2* est totalement absent dans les cellules B IgD+CD27+ supposées être de la zone marginale. Par ailleurs, S Weller et col. ont montré que les cellules B IgD+CD27+ ont des CDR3 courts (74), à l'opposé des SMZL. L'étude *IGHV* des lymphomes pose donc la question de l'origine réelle des cellules tumorales dans les SMZL.

Pour Crowe comme pour Dunn Walters, la surreprésentation des remaniements des gènes *IGHV3*, et plus particulièrement des gènes *IGHV3-23* évoque les lymphocytes B IgM+IgD+CD27+ en premier lieu. Cette surreprésentation est une caractéristique des LPL/WM qui sont IgM+IgD-. Le groupe de Treon a rapporté que CD27 n'est pas exprimé dans les LPL/WM. La très haute fréquence de mutations des *IGHV* ne correspond pas aux fréquences de mutations rapportées dans les cellules B IgM+IgD+. La comparaison du

répertoire *IGHV* des LPL/WM avec celui publié des cellules normales pose donc la question de l'origine de la cellule tumorale pour ces lymphomes.

Nous avons recherché la mutation ponctuelle *MYD88* L265P dans ces lymphomes suite à la parution des résumés du groupe de Treon au congrès de l'ASH 2011. Seule la mutation ponctuelle *MYD88* L265P a été recherchée dans la série, un résultat négatif ne prouve donc pas qu'il n'existe pas d'altération du gène *MYD88*. En effet, depuis ce travail, nous avons extensivement séquencé le gène *MYD88* dans ces lymphomes et d'autres mutations ont été retrouvées comme *MYD88* S219C retrouvée dans deux cas supplémentaires de LPL/WM (résultats non publiés).

La présence de la mutation peut donc avoir un pouvoir prédictif positif sur le diagnostic de LPL/WM puisqu'elle est plutôt associée à ce lymphome (67% des cas de LPL/WM). Ce résultat va dans le sens de l'évolution de la classification OMS où en 2008, le pic monoclonal IgM n'est plus seulement un symptôme clinique mais plutôt un critère diagnostique de LPL/WM. Autrement dit, le LPL/WM est définitivement individualisé comme un lymphome à infiltration médullaire prédominante par des cellules lymphoplasmocytaires et un pic IgM.

Le pourcentage de mutations *MYD88* L265P était de 55% dans la catégorie LPL/WM avec atteinte médullaire isolée contre 75% dans la catégorie LPL/WM avec atteinte ganglionnaire associée (pourcentages modifiés par rapport à la publication du fait de l'intégration de nouveaux résultats disponibles pour cette série). Cette différence conforte notre hypothèse de classement d'autant plus qu'il n'existe aucune différence entre les deux catégories en termes de profils *IGHV*. Ceci suggère que les cas avec infiltration médullaire par des cellules lymphoplasmocytaires associés à un pic IgM sont des lymphomes LPL/WM quelque soit le degré de dissémination tumorale.

Tous les cas mutés *MYD88* L265P présentent un pic IgM et suggèrent qu'ils appartiennent au même groupe de lymphome, autrefois appelé le syndrome d'hyperviscosité.

La mutation *MYD88* L265P a pour conséquence l'activation constitutive de la voie NF-kappa B, suggérant ainsi que NF-kappa B joue un rôle physiopathologique dans le développement de la maladie et que les thérapies ciblant cette voie, comme le bortezomib, pourraient être efficaces.

Deux cas de SMZL ainsi que deux cas de lymphomes du MALT à infiltration oculaire présentaient la mutation *MYD88 L265P*. Une relecture anatomo-pathologique a confirmé ces diagnostics. Tous les cas présentaient un pic monoclonal à IgM. Pour un cas, la détection de ce pic a été à l'origine du diagnostic. Un seul cas était exempt d'infiltration médullaire. Les frottis médullaires ont montré, pour les 3 cas restants, qu'il existait une différenciation lymphoplasmocytaire plus ou moins marquée et pour un cas de SMZL, des mastocytes étaient associés au clone lymphoplasmocytaire. Malgré une histologie compatible avec le diagnostic de ZML, ceci pose le problème du diagnostic différentiel avec le LPL/WM et suggère que la détection de la mutation *MYD88 L265P* pourrait être incluse dans les critères diagnostiques du LPL/WM.

Notre série comporte 11 cas de NMZL. Conformément aux critères de la classification OMS 2008, aucun cas ne comporte d'infiltration splénique ou extra-ganglionnaire mais 27% des cas présentent une infiltration médullaire avec une différenciation plasmocytaire plus ou moins marquée. Ceci est conforme à la littérature et pose, comme habituellement, le problème du diagnostic différentiel avec le LPL/WM. Cependant aucun patient ne présente de pic monoclonal et cette absence de pic monoclonal permet de les opposer aux cas de LPL/WM.

En résumé et à l'issue de ce travail, nous proposons une démarche pratique de caractérisation génétique diagnostique des SMZL, NMZL et LPL/WM :

Le SMZL est caractérisé par l'utilisation des *IGHV1* ou *IGHV4* (71% des cas dans notre série), un CDR3 long >17Aa (75% des cas), une absence de pression de sélection (80%) et peu de mutations *MYD88 L265P* (4%).

Le NMZL est caractérisé par l'utilisation des *IGHV3*, un CDR3 long (55%), un profil peu muté inférieur à 2% dans 73% des cas de notre série, une absence de pression de sélection (64%), une absence de pic monoclonal et de mutation *MYD88 L265P*.

Le LPL/WM est caractérisé par l'utilisation des *IGHV3* (77%), souvent un *IGHV3-23* ou *IGHV3-7* (58% des cas présentent un de ces gènes), un CDR3 court (87%), un profil très muté supérieur à 5% (77%), avec une pression de sélection (90%) et une mutation de *MYD88 L265P*.

Notre étude permet de dégager un arbre décisionnel diagnostique dans les cas disséminés de ZML ou LPL/WM (figure 48).

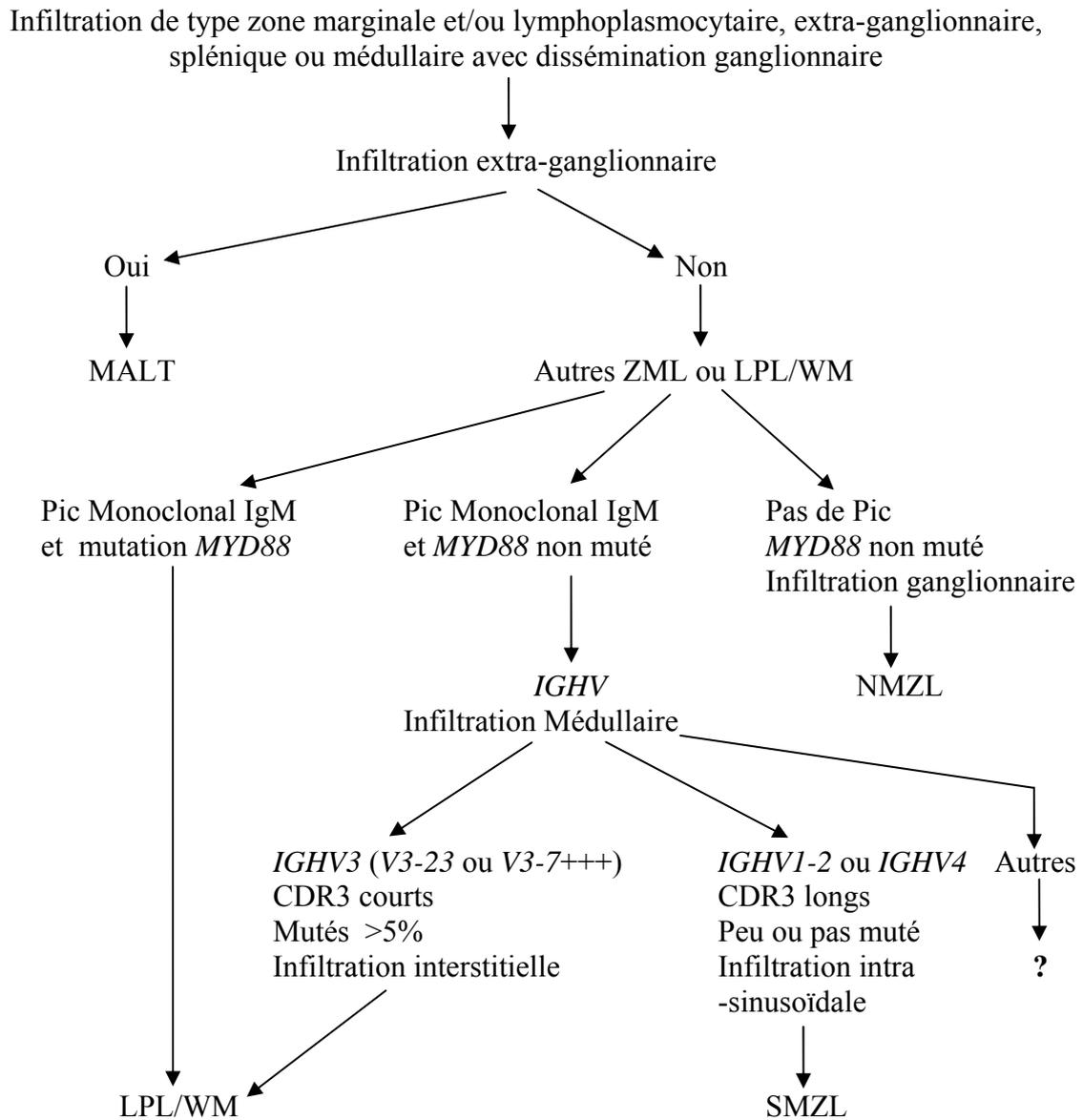


Figure 48 : arbre décisionnel diagnostique des cas disséminés de MZL et LPL/WM

Chapitre 7 : Discussion

Dans ce travail, nous avons extensivement caractérisé le répertoire *IGHV* des lymphomes de la zone marginale de la rate, du ganglion et du MALT, ainsi que des LPL/WM. De plus, nous avons recherché la mutation *MYD88* L265P dans ces lymphomes. Nos résultats conduisent à clairement affirmer que ces quatre entités sont différentes au plan clinique, du point de vue de la relation à l'antigène, de l'origine cellulaire et du mécanisme de transformation. Cette affirmation n'avait que peu de support expérimental solide jusqu'à cette année, et nous croyons que notre travail a contribué à clarifier les relations entre ces quatre entités.

Les caractéristiques cliniques cardinales de ces quatre lymphomes

Nous n'allons pas répéter à ce niveau ce qui a été dit dans l'introduction. Cependant, nous pouvons insister sur les points suivants.

1) A notre sens, on ne peut pas faire de diagnostic de NMZL s'il existe un pic IgM associé.

2) A l'inverse, le diagnostic de WM/LPL n'est possible que s'il existe un pic IgM. A priori, un supposé LPL sans pic IgM doit être classé en NMZL ou autre lymphome, quelque soit le degré de différenciation plasmocytaire. Autrement dit, le LPL pur (LPL non Waldenström) n'existe pas.

3) L'existence d'un remaniement *IGHV1-2* avec une splénomégalie doit faire poser le diagnostic de SMZL en 1^{ère} hypothèse, *a fortiori* s'il existe un motif stéréotypé.

4) Hors les MALT, la présence d'une mutation sur le gène *MYD88* associé à un pic IgM doit conduire au diagnostic de LPL/WM, quelque soit le diagnostic histopathologique. S'il s'agit d'une infiltration extranodale, le diagnostic de localisation secondaire d'un possible LPL/WM doit être envisagé, surtout s'il existe une dissémination médullaire.

Des patients doivent échapper à cette catégorisation. Par exemple, comment diagnostiquer un lymphome ganglionnaire pur avec pic IgM non muté pour *MYD88* (figure 48). Des études futures permettront sans doute de répondre à cette question.

La place de la stimulation à l'antigène dans les SMZL et les WM/LPL.

La fréquence de l'infection par l'HCV de notre série de SMZL est de 2% (non publiée). L'hypothèse d'une stimulation microbienne chronique est supposée pour les cas de SMZL non infectés par l'HCV. La structure anatomique de la rate humaine est remarquable. Les cellules B de la zone marginale sont au contact des sinusoides. Ces capillaires sont dépourvus de membrane basale. Ils possèdent un épithélium discontinu formé de nombreux interstices entre les cellules épithéliales qui le font ressembler à un grillage plus qu'à une paroi vasculaire. Ceci assure une exposition optimale des cellules immunitaires aux antigènes circulants. L'anticorps issu de l'*IGHV1-2* avec motif canonique présente une réactivité avec des antigènes du soi notamment des auto-antigènes sériques (171). Cette polyréactivité est en faveur d'une stimulation antigénique continue au sein des sinusoides sanguins qui contribuerait à une activation lymphocytaire puis à la formation d'un lymphome. Un argument en faveur de cette hypothèse est l'efficacité de la splénectomie qui constitue l'attitude thérapeutique de première ligne chez les patients symptomatiques (155). La splénectomie qui permet une rémission du lymphome supprimerait radicalement cette exposition à l'antigène.

En accord avec une stimulation antigénique continue, dans les SMZL, le motif canonique du CDR3 de l'*IGHV1-2*04* constitue une preuve indirecte d'une sélection lymphocytaire par le BCR. La séquence nucléotidique et la position des mutations somatiques sur l'*IGHV* peuvent donner quelques éléments sur l'antigène en cause. Le tryptophane dans le FR3, spécifique de l'allèle 04, préservé malgré le processus d'hypermutation somatique, suggère que l'antigène pourrait être un superantigène. Les travaux de Delabie et al. montrant la polyréactivité du motif canonique ITIFGVVII avec des auto-antigènes ubiquitaires sont compatibles avec l'hypothèse que les SMZL pourraient dériver des cellules B polyréactives (171). La fixation à un antigène exogène ou du soi par un motif conservé quelque soit le statut mutationnel et indépendamment du CDR3 suggère que les cellules tumorales proviennent d'une cellule B de la zone marginale produisant un anticorps naturel. Le deuxième gène le plus fréquemment retrouvé dans les SMZL est l'*IGHV4-34*. A l'origine, ce gène était connu pour sa capacité à fixer un antigène érythrocytaire, le i. L'antigène i est une chaîne oligosaccharidique formée de sous-unités de N-acetyllactosamine. Ce motif sucré est naturellement reconnu par l'*IGHV4-34*, indépendamment du CDR3. L'anticorps formé de l'*IGHV4-34* est également capable de se fixer aux cellules B présentant l'isoforme glycosylée

du CD45 (B220) qui contient la N-acétyllactosamine pour les stimuler (251). Cette propriété de l'*IGHV4-34* a été décrite dans les pathologies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé ou le syndrome de Wiskott-Aldrich (252, 253). Dans les cas de SMZL, l'*IGHV4-34* présente le motif conservé malgré la présence de mutations somatiques permettant ainsi la fixation à un N-acétyllactosamine présent dans les antigènes du soi ou les antigènes exogènes puis l'activation d'une signalisation indépendamment de la fixation classique à un épitope spécifique (168).

Le profil mutationnel des IGHV dans les LPL/WM et la courte taille des CDR3 évoquent indubitablement un lymphocyte B post-centre germinatif de la réponse T-dépendante. Néanmoins, la sur-représentation des remaniements *IGHV3* et surtout *IGHV3-23* évoque la réponse aux germes bactériens. Ces gènes sont décrits comme efficaces contre les polysaccharides bactériens comme le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de type 23F ou de l'*Haemophilus influenzae* de type b (254, 255). L'*IGHV3-23* fait partie des 3 gènes particulièrement performants. Or les polysaccharides bactériens ont la capacité de déclencher l'immunité T indépendante impliquant les cellules B de la zone marginale (67). De fait, les gènes *IGHV3* et l'*IGHV3-23* font partie des *IGHV* fréquemment utilisés par les cellules IgM⁺ CD27⁺ de la zone marginale (75).

Dans la maladie de Waldenström, l'immunoglobuline monoclonale peut être responsable d'anémies hémolytiques auto-immunes par son interaction avec des antigènes du globule rouge. Cette réactivité est fortement liée à des polysaccharides bactériens (réactivité croisée) (256). L'activité de l'immunoglobuline pourrait être le reflet indirect du rôle d'une stimulation antigénique impliquée dans le développement de la maladie. De même les études épidémiologiques démontrent que le risque de survenue de LPL/WM est plus important dans un contexte infectieux chronique. Dans une étude de cohorte de vétérans américains, le risque de survenue de LPL/WM est deux à trois fois plus élevé chez les patients atteints de maladies auto-immunes et les patients présentant une hépatite, une immunodéficience virale ou une rickettsiose (257). Dans une étude suédoise, le risque de survenue de LPL/WM est augmenté chez les patients atteints de maladies auto-immunes : syndrome de Sjogren, anémie hémolytique auto-immune, syndrome de Guillain Barré, prostatite chronique ou gingivites. Après étude des antécédents des patients, ce risque est associé à un contexte infectieux de type pneumonie, septicémie, sinusite, pyélonéphrite ou herpes (258). Ainsi l'infection chronique et l'auto-immunité jouent un rôle dans la survenue du LPL/WM mais les

mécanismes physiopathologiques sont mal connus (259). L'ensemble de ces données de la littérature et des nôtres souligne un paradoxe. L'antigène impliqué dans le LPL/WM serait de nature polysaccharidique, bactérien ou du soi. De ce point de vue, la surreprésentation des gènes *IGHV3-23* est compatible. Mais les *IGHV* de ces lymphomes portent l'empreinte du passage dans le centre germinatif, posant la question de la dépendance au lymphocyte T de la réponse à l'antigène dans les lymphomes. Nous rediscuterons de ce paradoxe lorsque sera évoqué l'origine cellulaire de ce lymphome.

L'origine cellulaire des SMZL, des LPL/WM et des NMZL

Le répertoire restreint des *IGHV* ainsi que la présence de CDR3 similaires suggèrent qu'un mécanisme de sélection par un antigène spécifique pourrait contribuer au développement des SMZL. La taille augmentée des CDR3, le taux de mutation faible et l'absence de pression de sélection selon le modèle de Lossos suggèrent que leur contrepartie normale n'est pas un lymphocyte sélectionné positivement dans le centre germinatif mais plutôt un lymphocyte polyréactif issu d'un parcours indépendant du centre germinatif ayant un répertoire pré-diversifié. Le phénotype de ces cellules tumorales, IgM⁺fort, IgD⁺ faible, CD27⁺, CD23⁻, CD5⁻ est proche de celui des cellules de la zone marginale normale. De plus, une dérégulation de la signalisation Notch a été rapportée dans ces lymphomes, évoquant aussi l'origine cellule B de la zone marginale.

Cependant comme cela a été évoqué dans la discussion de notre 2^{ème} article, la surreprésentation des gènes *IGHV1-2* et l'existence de CDR3 particulièrement longs ne correspondent pas aux lymphocytes B IgM⁺IgD⁺CD27⁺ de la zone marginale. Des réarrangements des gènes *IGHV1-2* sont présents dans les cellules B naïves IgD⁺CD27⁻. Mais, une particularité à ce motif stéréotypé est que le segment D est quasiment entier et est exempt de mutation, ce dernier point impliquant très vraisemblablement que la cellule tumorale n'est pas passée par le centre germinatif. Dans notre série, le gène *IGHV1-2* avec motif stéréotypé est réarrangé avec le segment *IGHJ4* dans 50% des cas (non publié), remaniement correspondant plutôt aux cellules B mémoires en général. Les caractéristiques *IGHV* des SMZL n'existent pas dans les sous-populations B normales (ou du moins les cellules B correspondantes sont en trop faible proportion pour être identifiées). Si les cellules B tumorales de SMZL ont pour équivalent non tumoral la cellule B IgM⁺IgD⁺CD27⁺ de la zone marginale, la question est alors de savoir quel est l'antigène capable d'induire une telle expansion de lymphocytes B supposés prédiversifiés pour lesquels les gènes *IGHV1-2*

réarrangés associés à un CDR3 long avec motif stéréotypé sont extrêmement minoritaires, s'ils existent. Alternativement, malgré les ressemblances phénotypiques avec les cellules B IgM+IgD+CD27+, on peut aussi supposer que la contrepartie non tumorale des SMZL n'a pas été véritablement identifiée à ce jour.

Dans notre série, les cas de LPL/WM sont tous très mutés. La distribution des mutations sur les séquences *IGHV* suggèrent qu'il y a eu un processus d'hypermutation somatique efficace, sélectionnant le lymphocyte d'origine par une pression de sélection pour arriver à une meilleure affinité de son BCR. Ce sont des caractéristiques des cellules B mémoires issues d'une rencontre avec l'antigène dans un contexte T-dépendant.

Comme discuté ci-dessus, il existe également des arguments indirects suggérant que la contrepartie normale du WM/LPL n'est pas une cellule post-centre germinatif. Notamment, le répertoire *IGHV* utilisé évoque plutôt le compartiment B de la zone marginale avec une sur-représentation des remaniements *IGHV3* et plus particulièrement *IGHV3-23*.

Le LPL/WM est décrit comme un lymphome B mémoire. Le marqueur associé aux cellules B mémoires est le CD27. Or la plupart des cellules tumorales de WM/LPL ne possèdent pas le CD27 à leur surface (211, 215). Il existe bien des cellules clonales CD27+ mais elles représentent un petit contingent comparé à celui des cellules B CD27 négatives. Ceci est d'autant plus intrigant que le CD27 est connu comme étant le plus souvent positif dans les lymphomes B même lorsque ces derniers proviennent de cellules B naïves comme le lymphome du manteau (260). Comme dit en introduction, deux nouvelles populations B mémoires ont été décrites (80). Elles n'expriment pas le CD27 et sont soit commutées IgD- IgM- soit non commutées IgD- IgM+. Cette deuxième population CD27- IgD- IgM+ présente une surreprésentation de l'*IGHV3-23*. Nous suggérons qu'elles pourraient être à l'origine des LPL/WM.

Une des caractéristiques cytologiques du LPL/WM est la présence de cellules B à différents stades de maturation avec lymphocytes B matures, des lymphoplasmocytes et des plasmocytes du même clone tumoral. On peut proposer également une autre hypothèse d'origine cellulaire. Il a été montré, chez la souris, que les cellules B mémoires de la zone marginale peuvent être recrutées dans une structure de type centre germinatif pour générer plusieurs populations : des cellules B de type IgM mutées, des plasmocytes sécrétant une IgM, des cellules B qui ont commuté en IgG, des plasmocytes sécrétant une IgG. Les cellules

B de la zone marginale pourraient ainsi alimenter les différents compartiments B mémoires. Une cellule pourrait être au départ de type zone marginale puis terminer son parcours en cellule de type centre germinatif. Ainsi la cellule à l'origine des LPL/WM pourrait être une cellule de type zone marginale, ce qui expliquerait le répertoire *IGHV* mais cette cellule aurait été mobilisée dans un centre germinatif, ce qui expliquerait le fort taux de mutations somatiques de ces cas.

Les NMZL présentent un profil peu muté inférieur à 2% et une absence de pression de sélection. Les *IGHV3* sont connus pour leur capacité intrinsèque à la mutation et aux événements de recombinaison comme les conversions lorsqu'ils sont en présence de AID (261). Ceci explique pourquoi les *IGHV3* sont souvent les plus mutés dans les répertoires utilisés par les cellules tumorales B. Il est donc étonnant de retrouver dans les NMZL, un répertoire *IGHV3* peu muté. Cela suggère que la cellule d'origine n'a pas été confrontée à un processus de mutation.

Dans notre série, les NMZL sont caractérisés par une absence de sécrétion d'IgM, un CDR3 long (55%) associé à l'autoréactivité, un profil peu muté inférieur à 2% dans 73% des cas et une absence de pression de sélection (64%). Le candidat le plus naturel serait un lymphocyte B naïf possiblement autoréactif résidant dans la zone marginale du ganglion.

Au total, les NMZL ont le plus souvent un profil *IGHV* non muté, avec un répertoire finalement assez proche des lymphocytes B naïfs CD27-. A notre connaissance, l'expression de CD27 n'a pas été publiée dans ces lymphomes. L'hypothèse la plus simple est que la contrepartie non tumorale corresponde à une cellule B naïve folliculaire. Néanmoins, dans notre série, 30% de ces cas avec un *IGHV* muté. Ceci pose la question de savoir s'il existe un sous-groupe avec *IGHV* muté comme cela a pu être montré dans les lymphomes du manteau que l'on supposait initialement dérivé d'un lymphocyte B pré-centre germinatif.

Activation NF-kappa B et lymphomes B

De très nombreuses revues sont consacrées au rôle de NF-kappa B dans la lymphomagenèse, et le groupe de L. Staudt a permis des avancées majeures dans le domaine (47). La présence de mutations activatrices sur le gène *MYD88* suggère clairement que l'activation NF-kappa B est importante dans les LPL/WM. Cette mutation n'est pas spécifique des LPL/WM puisqu'elle a été initialement décrite dans les lymphomes diffus à grandes cellules de phénotype activé (ABC DLBCL). Dans ces lymphomes, de nombreuses

mutations activatrices de NF-kappa B ont été rapportées, notamment sur le gène A20. Les mutations inactivatrices d'A20 ont été également décrites dans les lymphomes du MALT (262, 263). Ces lymphomes sont tous associés la différenciation plasmocytaire. Ainsi, ni l'activation NF-kappa B ni les mutations *MYD88* ne sont véritablement pathognomoniques des LPL/WM. La mutation de *MYD88* a en effet aussi été rapportée dans les LLC avec *IGHV* muté (264). Néanmoins, dans le contexte des lymphomes indolents négatifs pour le CD5, cette mutation semble très spécifique des LPL/WM. Cette mutation serait d'ailleurs présente dès l'émergence du clone, comme le suggère sa présence dans les MGUS à IgM (265).

Par contre, l'activation continue de NF-kappa B pourrait être associée à la différenciation plasmocytaire. En effet, une des cibles de NF-kappa B est le facteur de transcription IRF4/Mum1 associé à la différenciation plasmocytaire précoce. Ceci pose la question du pronostic des lymphomes avec différenciation plasmocytaire. Notre groupe avait montré en 2005 que la différenciation plasmocytaire morphologique avec l'expression d'IRF4/Mum1, dans les lymphomes de la zone marginale est un facteur de mauvais pronostic (266). A l'époque, et pour ce travail, il existait une grande confusion entre lymphomes de la zone marginale et LPL/WM. Ainsi, la question du pronostic des LPL/WM et des lymphomes de la zone marginale avec les critères de 2012 est reposée. A ce sujet, les études en TMA menées avec M Parrens et I Soubeyran sur les cas de notre série ont montré que le marqueur IRF4 n'est pas exprimé dans les cellules tumorales des lymphomes de la zone marginale (résultats non publiés).

Malgré l'absence d'expression d'IRF4 dans les lymphomes de la zone marginale, et bien que la mutation *MYD88* ne soit pas ou soit peu retrouvée, quelque soit l'organe infiltré, les études transcriptomiques permettent de détecter la signature de l'activation NF-kappa B. D'ailleurs, comme évoqué ci-dessus et dans l'introduction, les lymphomes du MALT sont associés à des translocations spécifiques et/ou des mutations géniques responsables d'une activation NF-kappa B continue. Cet exemple conduit à poser la question des mutations des autres acteurs de l'activation NF-kappa B dans les SMZL et les NMZL, comme par exemple les mutations de A20, CARD11, TRAF2, TRAF5, MAP3K7 (TAK1) et TNFRSF11A (RANK), et des autres voies d'activation associées à celle de NF-kappa B comme STAT3 notamment (47).

Chapitre 8 : Conclusion et perspectives

Ce travail a contribué à mieux caractériser le SMZL, NMZL et LPL/WM et permis d'affiner les diagnostics. Il a prouvé que les caractéristiques *IGHV* des SMZL et des NMZL sont différentes de celles des LPL/WM et qu'il s'agissait de deux maladies distinctes provenant de deux compartiments cellulaires ayant des expositions à l'antigène différentes.

Nous avons fait émerger des caractéristiques spécifiques du NZML contribuant à mieux l'individualiser au sein des ZML. Des critères génétiques spécifiques de chaque lymphome ont été mis en évidence pour aboutir à la proposition de clés de différenciation du SMZL, NMZL et LPL/WM. Nous avons prouvé que ces 3 types de lymphomes sont des entités distinctes ayant des histoires d'exposition antigénique différentes. Nous avons montré que la mutation L265P de *MYD88* est fortement associée au diagnostic de LPL/WM et nous suggérons d'inclure la recherche de cette mutation dans les critères diagnostiques de ce lymphome.

Contrairement aux lymphomes viro-induits où les cellules tumorales sont infectées par un virus directement responsable de la transformation maligne, les lymphomes de la zone marginale sont un modèle de lymphomes indirectement associés à des agents ou un contexte pathogène. Un agent pathogène mettrait à disposition des cellules B un environnement antigénique continu propice à leur prolifération et expansion. Une infection chronique et/ou un processus inflammatoire prolongés et continus augmenteraient les chances d'une transformation maligne ouvrant ainsi la porte à la survenue d'événements oncogéniques primaires puis secondaires aboutissant à un clone tumoral.

Cette stimulation prolongée pourrait entraîner des aberrations génétiques au cours des multiplications cellulaires avec pour cible potentielle des acteurs de l'activation cellulaire B, et principalement ceux de la voie NF-kappa B. La voie NF-kappa B est la voie la plus commune utilisée dans les cellules tumorales pour limiter la mort cellulaire et assurer la survie. L'activation constitutive de NF-kappa B est décrite dans des pathologies lymphoïdes malignes, comme la maladie de Hodgkin, les lymphomes B diffus à grandes cellules de type ABC, le myélome multiple ou le lymphome du MALT. Dans les SMZL, des lésions multiples des gènes impliqués dans la voie NF-kappa B ont récemment été montrées dans 30% des cas (250, 267). Cela reste à étudier dans les NMZL et LPL/WM.

L'hypothèse d'une contrepartie normale proche de chaque lymphome et les connaissances de plus en plus approfondies de la différenciation B normale nous permettent également d'étudier d'autres voies. Dans les SMZL, il a été montré que la voie NOTCH2, essentielle au développement des cellules B de la zone marginale, est altérée dans 60% des cas (268). Cela ouvre un champ d'investigation nouveau pour les NMZL et LPL/WM.

Ainsi les perspectives de ce travail seraient d'identifier les aberrations génétiques contribuant au processus de cancérisation par une technique de reséquençage à haut débit, tout à fait adaptée à ce type d'exploration. L'exploration fonctionnelle des allèles mutants identifiés pourra ensuite permettre de comprendre la part de ces anomalies génétiques dans le modèle physiopathologique.

Bibliographie

Bibliographie

1. Harris NL JE, Stein H, Vardiman JW (eds). *World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. IARC Press:Lyon 2001.
2. Mihaescon E, Seligman M, Frangione B. Heavy-light chain disulphide bridge common to A1 and a genetic variant of A2 immunoglobulins. *Nature: New biology* 1971 Aug; **232**(33): 220-221.
3. Charles A. Janeway KM, Paul Travers , Mark Walport *Immunobiologie*, 3e édition edn. De Boeck 2009.
4. Lefranc J-LAG. *Immunologie humaine* De Boeck Université, 2009.
5. Sciences EBL. Immunoglobulin Molecules. Date d'édition: Date de dernière mise à jour, date d'accèsion: 8/12/2012. Disponible sur: <http://www.easternbiotech.com/Immune-System.php>.
6. IMGT®. IMGT Education : IMGT teaching resources for immunology and immunogenetics. Date d'édition: 03/08/12. Date de dernière mise à jour: 10/12/12, date d'accèsion: 03/12/12. Disponible sur: <http://www.imgt.org/IMGTeducation/>.
7. Barbie V, Lefranc MP. The human immunoglobulin kappa variable (IGKV) genes and joining (IGKJ) segments. *Experimental and clinical immunogenetics* 1998; **15**(3): 171-183.
8. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes. *Experimental and clinical immunogenetics* 2001; **18**(3): 161-174.
9. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M[et al.]. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003 Dec; **17**(12): 2257-2317.
10. Lefranc MP, Pommie C, Ruiz M[et al.]. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Developmental and comparative immunology* 2003 Jan; **27**(1): 55-77.
11. Pallares N, Fripiat JP, Giudicelli V[et al.]. The human immunoglobulin lambda variable (IGLV) genes and joining (IGLJ) segments. *Experimental and clinical immunogenetics* 1998; **15**(1): 8-18.
12. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Experimental and clinical immunogenetics* 2001; **18**(2): 100-116.
13. Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH[et al.]. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Advances in immunology* 2005; **86**: 43-112.
14. Gachard N, Parrens M, Soubeyran I[et al.]. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia* 2012 Sep 4.
15. Lewis SM, Wu GE. The origins of V(D)J recombination. *Cell* 1997 Jan 24; **88**(2): 159-162.

16. Cobb RM, Oestreich KJ, Osipovich OA[et al.]. Accessibility control of V(D)J recombination. *Advances in immunology* 2006; **91**: 45-109.
17. Sen R, Oltz E. Genetic and epigenetic regulation of IgH gene assembly. *Current opinion in immunology* 2006 Jun; **18**(3): 237-242.
18. Roth DB, Craig NL. VDJ recombination: a transposase goes to work. *Cell* 1998 Aug 21; **94**(4): 411-414.
19. Schatz DG, Baltimore D. Uncovering the V(D)J recombinase. *Cell* 2004 Jan 23; **116**(2 Suppl): S103-106, 102 p following S106.
20. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R[et al.]. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annual review of immunology* 2006; **24**: 541-570.
21. Difilippantonio MJ, McMahan CJ, Eastman QM[et al.]. RAG1 mediates signal sequence recognition and recruitment of RAG2 in V(D)J recombination. *Cell* 1996 Oct 18; **87**(2): 253-262.
22. Gauss GH, Lieber MR. Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 1996 Jan; **16**(1): 258-269.
23. Tuaille N, Capra JD. Evidence that terminal deoxynucleotidyltransferase expression plays a role in Ig heavy chain gene segment utilization. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2000 Jun 15; **164**(12): 6387-6397.
24. Giudicelli V. LM. Immunoglobulin (IG) synthesis. Date d'édition: Ginestoux C. Date de dernière mise à jour: 09/12/12, date d'accession: Disponible sur: <http://www.imgt.org/IMGTindex/IGsynthesis.html>.
25. IMGT. IMGT/V-QUEST Search page IMGT/V-QUEST programme version: 3.2.29 (17 September 2012) ed: IMGT; 2012.
26. Bene MC, Castoldi G, Knapp W[et al.]. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995 Oct; **9**(10): 1783-1786.
27. Sevilla DW, Colovai AI, Emmons FN[et al.]. Hematogones: a review and update. *Leukemia & lymphoma* 2010 Jan; **51**(1): 10-19.
28. Burda P, Laslo P, Stopka T. The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia* 2010 Jul; **24**(7): 1249-1257.
29. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009 Jul 1; **15**(13): 4263-4269.
30. Ye M, Graf T. Early decisions in lymphoid development. *Current opinion in immunology* 2007 Apr; **19**(2): 123-128.
31. LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 2000 Jul 1; **96**(1): 9-23.
32. Nodland SE, Berkowska MA, Bajer AA[et al.]. IL-7R expression and IL-7 signaling confer a distinct phenotype on developing human B-lineage cells. *Blood* 2011 Aug 25; **118**(8): 2116-2127.

33. Nagata K, Nakamura T, Kitamura F[et al.]. The Ig alpha/Igbeta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity* 1997 Oct; **7**(4): 559-570.
34. Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nature reviews Immunology* 2009 Mar; **9**(3): 195-205.
35. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annual review of immunology* 2006; **24**: 287-320.
36. Brady BL, Steinel NC, Bassing CH. Antigen receptor allelic exclusion: an update and reappraisal. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2010 Oct 1; **185**(7): 3801-3808.
37. von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nature immunology* 2010 Jan; **11**(1): 14-20.
38. Melchers F, Rolink A, Grawunder U[et al.]. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Current opinion in immunology* 1995 Apr; **7**(2): 214-227.
39. Cedar H, Bergman Y. Choreography of Ig allelic exclusion. *Current opinion in immunology* 2008 Jun; **20**(3): 308-317.
40. Chemin G, Tinguely A, Sirac C[et al.]. Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig kappa transcripts. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2010 May 1; **184**(9): 5009-5017.
41. Vettermann C, Schlissel MS. Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunological reviews* 2010 Sep; **237**(1): 22-42.
42. Chatenoud L. BJ. *Immunologie* 6e édition edn, 2012.
43. Nemazee D, Buerki K. Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Oct; **86**(20): 8039-8043.
44. Shlomchik MJ. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity* 2008 Jan; **28**(1): 18-28.
45. Luning Prak ET, Monestier M, Eisenberg RA. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011 Jan; **1217**: 96-121.
46. Briney BS, Willis JR, Hicar MD[et al.]. Frequency and genetic characterization of V(DD)J recombinants in the human peripheral blood antibody repertoire. *Immunology* 2012 Sep; **137**(1): 56-64.
47. Staudt LM. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010 Jun; **2**(6): a000109.
48. Wertz IE, Dixit VM. Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010 Mar; **2**(3): a003350.
49. Alexopoulou L, Desnues B, Demaria O. [Toll-like receptor 8: the awkward TLR]. *Medecine sciences : M/S* 2012 Jan; **28**(1): 96-102.
50. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM[et al.]. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 1998 Feb 19; **391**(6669): 799-803.

51. Cyster JG, Ansel KM, Reif K[et al.]. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunological reviews* 2000 Aug; **176**: 181-193.
52. Legendre. Intéractions virus de l'immunodéficience humaine (VIH)/lymphocytes B au sein des tissus lymphoïdes secondaires. Université Paris V, 1998.
53. Solal-Céligny P BN, Fermé C, Gisselbrecht C, Reyes F, Coiffier B. *Lymphomes, Lymphomes non hodgkiniens, Maladie de Hodgkin*, Frison-Roche edn, 1997, 535pp.
54. Casola S, Otipoby KL, Alimzhanov M[et al.]. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nature immunology* 2004 Mar; **5**(3): 317-327.
55. Wirths S, Lanzavecchia A. ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *European journal of immunology* 2005 Dec; **35**(12): 3433-3441.
56. MacLennan I, Vinuesa C. Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* 2002 Sep; **17**(3): 235-238.
57. Lopes-Carvalho T, Foote J, Kearney JF. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. *Current opinion in immunology* 2005 Jun; **17**(3): 244-250.
58. Calame KL, Lin KI, Tunyaplin C. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annual review of immunology* 2003; **21**: 205-230.
59. Liu M, Schatz DG. Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. *Trends in immunology* 2009 Apr; **30**(4): 173-181.
60. Durandy A, Honjo T. Human genetic defects in class-switch recombination (hyper-IgM syndromes). *Current opinion in immunology* 2001 Oct; **13**(5): 543-548.
61. Martomo SA, Gearhart PJ. Somatic hypermutation: subverted DNA repair. *Current opinion in immunology* 2006 Jun; **18**(3): 243-248.
62. Chaudhuri J, Basu U, Zarrin A[et al.]. Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Advances in immunology* 2007; **94**: 157-214.
63. Wang L, Wuerffel R, Feldman S[et al.]. S region sequence, RNA polymerase II, and histone modifications create chromatin accessibility during class switch recombination. *The Journal of experimental medicine* 2009 Aug 3; **206**(8): 1817-1830.
64. Xu Z, Zan H, Pone EJ[et al.]. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nature reviews Immunology* 2012 Jul; **12**(7): 517-531.
65. Peron S, Laffleur B, Denis-Lagache N[et al.]. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* 2012 May 18; **336**(6083): 931-934.
66. Chan TD, Wood K, Hermes JR[et al.]. Elimination of germinal-center-derived self-reactive B cells is governed by the location and concentration of self-antigen. *Immunity* 2012 Nov 16; **37**(5): 893-904.
67. Defrance T, Taillardet M, Genestier L. T cell-independent B cell memory. *Current opinion in immunology* 2011 Jun; **23**(3): 330-336.

68. MacLennan IC, Casamayor-Palleja M, Toellner KM[et al.]. Memory B-cell clones and the diversity of their members. *Seminars in immunology* 1997 Aug; **9**(4): 229-234.
69. Mamani-Matsuda M, Cosma A, Weller S[et al.]. The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. *Blood* 2008 May 1; **111**(9): 4653-4659.
70. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V[et al.]. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature immunology* 2009 Dec; **10**(12): 1292-1299.
71. Bigler RD, Bushkin Y, Chiorazzi N. S152 (CD27). A modulating disulfide-linked T cell activation antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1988 Jul 1; **141**(1): 21-28.
72. Tangye SG, Liu YJ, Aversa G[et al.]. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *The Journal of experimental medicine* 1998 Nov 2; **188**(9): 1691-1703.
73. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *The Journal of experimental medicine* 1998 Nov 2; **188**(9): 1679-1689.
74. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annual review of immunology* 2009; **27**: 267-285.
75. Weller S, Braun MC, Tan BK[et al.]. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 2004 Dec 1; **104**(12): 3647-3654.
76. Weller S, Mamani-Matsuda M, Picard C[et al.]. Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. *The Journal of experimental medicine* 2008 Jun 9; **205**(6): 1331-1342.
77. Seifert M, Kuppers R. Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *The Journal of experimental medicine* 2009 Nov 23; **206**(12): 2659-2669.
78. Wu YC, Kipling D, Leong HS[et al.]. High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood* 2010 Aug 19; **116**(7): 1070-1078.
79. Fecteau JF, Cote G, Neron S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2006 Sep 15; **177**(6): 3728-3736.
80. Wu YC, Kipling D, Dunn-Walters DK. The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Frontiers in immunology* 2011; **2**: 81.
81. Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI[et al.]. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *The Journal of clinical investigation* 1997 May 15; **99**(10): 2488-2501.
82. Tian C, Luskin GK, Dischert KM[et al.]. Evidence for preferential Ig gene usage and differential TdT and exonuclease activities in human naive and memory B cells. *Mol Immunol* 2007 Mar; **44**(9): 2173-2183.

83. Rowley JD. Chromosomal patterns in myelocytic leukemia. *N Engl J Med* 1973 Jul 26; **289**(4): 220-221.
84. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature reviews Cancer* 2005 Apr; **5**(4): 251-262.
85. Frederico LA, Kunkel TA, Shaw BR. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* 1990 Mar 13; **29**(10): 2532-2537.
86. Zhang Y, Gostissa M, Hildebrand DG[et al.]. The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Advances in immunology* 2010; **106**: 93-133.
87. Arlt MF, Durkin SG, Ragland RL[et al.]. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA repair* 2006 Sep 8; **5**(9-10): 1126-1135.
88. Marians KJ. Replication and recombination intersect. *Current opinion in genetics & development* 2000 Apr; **10**(2): 151-156.
89. Lin C, Yang L, Rosenfeld MG. Molecular logic underlying chromosomal translocations, random or non-random? *Advances in cancer research* 2012; **113**: 241-279.
90. Gostissa M, Ranganath S, Bianco JM[et al.]. Chromosomal location targets different MYC family gene members for oncogenic translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Feb 17; **106**(7): 2265-2270.
91. Meaburn KJ, Misteli T, Soutoglou E. Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Seminars in cancer biology* 2007 Feb; **17**(1): 80-90.
92. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L[et al.]. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 2009 Oct 9; **326**(5950): 289-293.
93. Nussenzweig A, Nussenzweig MC. Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell* 2010 Apr 2; **141**(1): 27-38.
94. Jankovic M, Nussenzweig A, Nussenzweig MC. Antigen receptor diversification and chromosome translocations. *Nature immunology* 2007 Aug; **8**(8): 801-808.
95. Lefranc M. IGH@ (Immunoglobulin Heavy). 2000.
96. Obrador-Hevia A, Fernandez de Mattos S, Villalonga P[et al.]. Molecular biology of mantle cell lymphoma: from profiling studies to new therapeutic strategies. *Blood reviews* 2009 Sep; **23**(5): 205-216.
97. Lieber MR, Yu K, Raghavan SC. Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA repair* 2006 Sep 8; **5**(9-10): 1234-1245.
98. Marculescu R, Le T, Simon P[et al.]. V(D)J-mediated translocations in lymphoid neoplasms: a functional assessment of genomic instability by cryptic sites. *The Journal of experimental medicine* 2002 Jan 7; **195**(1): 85-98.
99. Murga Penas EM, Callet-Bauchu E, Ye H[et al.]. The t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1 translocation in MALT lymphomas contains templated nucleotide insertions and a major

- breakpoint region similar to follicular and mantle cell lymphoma. *Blood* 2010 Mar 18; **115**(11): 2214-2219.
100. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M[et al.]. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 2012 Oct 4; **490**(7418): 116-120.
 101. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T[et al.]. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001 Jul 19; **412**(6844): 341-346.
 102. Liu M, Duke JL, Richter DJ[et al.]. Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 2008 Feb 14; **451**(7180): 841-845.
 103. Honjo T, Kobayashi M, Begum N[et al.]. The AID dilemma: infection, or cancer? *Advances in cancer research* 2012; **113**: 1-44.
 104. Radcliffe CM, Arnold JN, Suter DM[et al.]. Human follicular lymphoma cells contain oligomannose glycans in the antigen-binding site of the B-cell receptor. *J Biol Chem* 2007 Mar 9; **282**(10): 7405-7415.
 105. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S[et al.]. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of clinical investigation* 1998 Oct 15; **102**(8): 1515-1525.
 106. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A[et al.]. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 2012 May 10; **119**(19): 4467-4475.
 107. Damle RN, Wasil T, Fais F[et al.]. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 Sep 15; **94**(6): 1840-1847.
 108. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A[et al.]. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 Sep 15; **94**(6): 1848-1854.
 109. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C[et al.]. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007 Jan; **21**(1): 1-3.
 110. Langerak AW, Davi F, Ghia P[et al.]. Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia* 2011 Jun; **25**(6): 979-984.
 111. Tobin G, Thunberg U, Johnson A[et al.]. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood* 2003 Jun 15; **101**(12): 4952-4957.
 112. Thorselius M, Krober A, Murray F[et al.]. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood* 2006 Apr 1; **107**(7): 2889-2894.
 113. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C[et al.]. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005 Feb 15; **105**(4): 1678-1685.

114. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A[et al.]. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 2008 Feb 1; **111**(3): 1524-1533.
115. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C[et al.]. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007 Jan 1; **109**(1): 259-270.
116. Vargas-Madrado E, Lara-Ochoa F, Ramirez-Benites MC[et al.]. Evolution of the structural repertoire of the human V(H) and V kappa germline genes. *International immunology* 1997 Dec; **9**(12): 1801-1815.
117. Bomben R, Dal Bo M, Capello D[et al.]. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. *British journal of haematology* 2009 Feb; **144**(4): 492-506.
118. Tobin G, Thunberg U, Johnson A[et al.]. Somatic mutations of Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002 Mar 15; **99**(6): 2262-2264.
119. Kostareli E, Gounari M, Agathangelidis A[et al.]. Immunoglobulin gene repertoire in chronic lymphocytic leukemia: insight into antigen selection and microenvironmental interactions. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 2012; **4**(1): e2012052.
120. Duhren-von Minden M, Ubelhart R, Schneider D[et al.]. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* 2012 Sep 13; **489**(7415): 309-312.
121. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N[et al.]. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* 2011 Sep 15; **118**(11): 3088-3095.
122. Kuper-Hommel MJ, van Krieken JH. Molecular pathogenesis and histologic and clinical features of extranodal marginal zone lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Leukemia & lymphoma* 2012 Jun; **53**(6): 1032-1045.
123. Isaacson PG, Du MQ. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nature reviews Cancer* 2004 Aug; **4**(8): 644-653.
124. Rosebeck S, Rehman AO, Lucas PC[et al.]. From MALT lymphoma to the CBM signalosome: three decades of discovery. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2011 Aug 1; **10**(15): 2485-2496.
125. Du MQ. MALT lymphoma: many roads lead to nuclear factor-kappaB activation. *Histopathology* 2011 Jan; **58**(1): 26-38.
126. Craig VJ, Arnold I, Gerke C[et al.]. Gastric MALT lymphoma B cells express polyreactive, somatically mutated immunoglobulins. *Blood* 2010 Jan 21; **115**(3): 581-591.
127. Bende RJ, Aarts WM, Riedl RG[et al.]. Among B cell non-Hodgkin's lymphomas, MALT lymphomas express a unique antibody repertoire with frequent rheumatoid factor reactivity. *The Journal of experimental medicine* 2005 Apr 18; **201**(8): 1229-1241.
128. Zhu D, Lossos C, Chapman-Fredricks JR[et al.]. Biased use of the IGHV4 family and evidence for antigen selection in Chlamydia psittaci-negative ocular adnexal extranodal marginal zone lymphomas. *PLoS One* 2011; **6**(12): e29114.

129. Sakuma H, Nakamura T, Uemura N[et al.]. Immunoglobulin VH gene analysis in gastric MALT lymphomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2007 Apr; **20**(4): 460-466.
130. Ferri C, Monti M, La Civita L[et al.]. Infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1993 Dec 15; **82**(12): 3701-3704.
131. Ito M, Masumi A, Mochida K[et al.]. Peripheral B cells may serve as a reservoir for persistent hepatitis C virus infection. *Journal of innate immunity* 2010; **2**(6): 607-617.
132. Arcaini L, Merli M, Volpetti S[et al.]. Indolent B-cell lymphomas associated with HCV infection: clinical and virological features and role of antiviral therapy. *Clinical & developmental immunology* 2012; **2012**: 638185.
133. Pozzato G, Mazzaro C, Crovatto M[et al.]. Low-grade malignant lymphoma, hepatitis C virus infection, and mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1994 Nov 1; **84**(9): 3047-3053.
134. de Sanjose S, Benavente Y, Vajdic CM[et al.]. Hepatitis C and non-Hodgkin lymphoma among 4784 cases and 6269 controls from the International Lymphoma Epidemiology Consortium. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2008 Apr; **6**(4): 451-458.
135. Arcaini L, Lazzarino M, Colombo N[et al.]. Splenic marginal zone lymphoma: a prognostic model for clinical use. *Blood* 2006 Jun 15; **107**(12): 4643-4649.
136. Suarez F, Lefrere F, Besson C[et al.]. Splenic lymphoma with villous lymphocytes, mixed cryoglobulinemia and HCV infection: deciphering the role of HCV in B-cell lymphomagenesis. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 2007 Sep; **39** Suppl 1: S32-37.
137. Saadoun D, Suarez F, Lefrere F[et al.]. Splenic lymphoma with villous lymphocytes, associated with type II cryoglobulinemia and HCV infection: a new entity? *Blood* 2005 Jan 1; **105**(1): 74-76.
138. Hermine O, Lefrere F, Bronowicki JP[et al.]. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002 Jul 11; **347**(2): 89-94.
139. Arcaini L, Paulli M, Boveri E[et al.]. Splenic and nodal marginal zone lymphomas are indolent disorders at high hepatitis C virus seroprevalence with distinct presenting features but similar morphologic and phenotypic profiles. *Cancer* 2004 Jan 1; **100**(1): 107-115.
140. Andrews DW, Capra JD. Complete amino acid sequence of variable domains from two monoclonal human anti-gamma globulins of the Wa cross-idiotypic group: suggestion that the J segments are involved in the structural correlate of the idiotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Jun; **78**(6): 3799-3803.
141. Charles ED, Green RM, Marukian S[et al.]. Clonal expansion of immunoglobulin M+CD27+ B cells in HCV-associated mixed cryoglobulinemia. *Blood* 2008 Feb 1; **111**(3): 1344-1356.
142. Marasca R, Vaccari P, Luppi M[et al.]. Immunoglobulin gene mutations and frequent use of VH1-69 and VH4-34 segments in hepatitis C virus-positive and hepatitis C virus-negative nodal marginal zone B-cell lymphoma. *The American journal of pathology* 2001 Jul; **159**(1): 253-261.

143. Chan CH, Hadlock KG, Fong SK[et al.]. V(H)1-69 gene is preferentially used by hepatitis C virus-associated B cell lymphomas and by normal B cells responding to the E2 viral antigen. *Blood* 2001 Feb 15; **97**(4): 1023-1026.
144. Charles ED, Brunetti C, Marukian S[et al.]. Clonal B cells in patients with hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia contain an expanded anergic CD21low B-cell subset. *Blood* 2011 May 19; **117**(20): 5425-5437.
145. Rosa D, Saletti G, De Gregorio E[et al.]. Activation of naive B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Dec 20; **102**(51): 18544-18549.
146. Chen Z, Zhu Y, Ren Y[et al.]. Hepatitis C virus protects human B lymphocytes from Fas-mediated apoptosis via E2-CD81 engagement. *PLoS One* 2011; **6**(4): e18933.
147. Isaacson PC, D.; Swerdlow, S.; Montserrat, E.; Berger, F.; Muller-Hermelink, HK.; Nathwani BH, NL. Splenic marginal zone lymphoma. In: Jaffe ES, H.; Vardiman, JW. (ed). *Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2001., pp 135-137.
148. Isaacson PB, F.; Swerdlow, SH.; Thieblemont, C.; Pittaluga, S.; Harris, NL. Splenic Marginal Zone Lymphoma. In: Swerdlow SH, NL.; Jaffe, ES.; Pileri, SA.; Stein, H.; Jurgens, T.; Vardiman, JW. (ed). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2008, pp 185-187.
149. Berger F, Felman P, Thieblemont C[et al.]. Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. *Blood* 2000 Mar 15; **95**(6): 1950-1956.
150. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Salles G[et al.]. Splenic marginal zone B-cell lymphoma: a distinct clinicopathological and molecular entity. Recent advances in ontogeny and classification. *Current opinion in oncology* 2011 Sep; **23**(5): 441-448.
151. Thieblemont C, Felman P, Callet-Bauchu E[et al.]. Splenic marginal-zone lymphoma: a distinct clinical and pathological entity. *The lancet oncology* 2003 Feb; **4**(2): 95-103.
152. Thieblemont C, Davi F, Noguera ME[et al.]. Splenic marginal zone lymphoma: current knowledge and future directions. *Oncology (Williston Park, NY)* 2012 Feb; **26**(2): 194-202.
153. Voinchet H, Etienne G, Ghiringelli CB[et al.]. [Splenic marginal zone lymphoma and autoimmunity: report of six cases]. *La Revue de medecine interne / fondee par la Societe nationale francaise de medecine interne* 2010 Jan; **31**(1): 4-11.
154. Thieblemont C, Felman P, Berger F[et al.]. Treatment of splenic marginal zone B-cell lymphoma: an analysis of 81 patients. *Clinical lymphoma* 2002 Jun; **3**(1): 41-47.
155. Matutes E, Oscier D, Montalban C[et al.]. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 2008 Mar; **22**(3): 487-495.
156. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R[et al.]. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994 Oct; **8**(10): 1640-1645.
157. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP[et al.]. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997 Oct; **108**(4): 378-382.

158. Papadaki T, Stamatopoulos K, Belessi C[et al.]. Splenic marginal-zone lymphoma: one or more entities? A histologic, immunohistochemical, and molecular study of 42 cases. *Am J Surg Pathol* 2007 Mar; **31**(3): 438-446.
159. Sole F, Salido M, Espinet B[et al.]. Splenic marginal zone B-cell lymphomas: two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7q. *Haematologica* 2001 Jan; **86**(1): 71-77.
160. Salido M, Baro C, Oscier D[et al.]. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood* 2010 Sep 2; **116**(9): 1479-1488.
161. Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S[et al.]. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Jan 27; **101**(4): 1039-1044.
162. Watkins AJ, Huang Y, Ye H[et al.]. Splenic marginal zone lymphoma: characterization of 7q deletion and its value in diagnosis. *The Journal of pathology* 2010 Mar; **220**(4): 461-474.
163. Vega F, Cho-Vega JH, Lennon PA[et al.]. Splenic marginal zone lymphomas are characterized by loss of interstitial regions of chromosome 7q, 7q31.32 and 7q36.2 that include the protection of telomere 1 (POT1) and sonic hedgehog (SHH) genes. *British journal of haematology* 2008 Jun; **142**(2): 216-226.
164. Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Mateo M[et al.]. MicroRNA losses in the frequently deleted region of 7q in SMZL. *Leukemia* 2007 Dec; **21**(12): 2547-2549.
165. Bouteloup M, Verney A, Rachinel N[et al.]. MicroRNA expression profile in splenic marginal zone lymphoma. *British journal of haematology* 2012 Jan; **156**(2): 279-281.
166. Gazzo S, Baseggio L, Coignet L[et al.]. Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 3q commonly gained in marginal zone B-cell lymphoma. *Haematologica* 2003 Jan; **88**(1): 31-38.
167. Braggio E, Dogan A, Keats JJ[et al.]. Genomic analysis of marginal zone and lymphoplasmacytic lymphomas identified common and disease-specific abnormalities. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2012 May; **25**(5): 651-660.
168. Bikos V, Darzentas N, Hadzidimitriou A[et al.]. Over 30% of patients with splenic marginal zone lymphoma express the same immunoglobulin heavy variable gene: ontogenetic implications. *Leukemia* 2012 e-pub ahead of print 27 January 2012; doi:10.1038/leu.2012.3.
169. Zibellini S, Capello D, Forconi F[et al.]. Stereotyped patterns of B-cell receptor in splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica* 2010 Oct; **95**(10): 1792-1796.
170. Aguilera I, Melero J, Nunez-Roldan A[et al.]. Molecular structure of eight human autoreactive monoclonal antibodies. *Immunology* 2001 Mar; **102**(3): 273-280.
171. Warsame AA, Aasheim HC, Nustad K[et al.]. Splenic marginal zone lymphoma with VH1-02 gene rearrangement expresses poly- and self-reactive antibodies with similar reactivity. *Blood* 2011 Sep 22; **118**(12): 3331-3339.
172. Piris MF, K.; Mollejo, M.; Campo, E.; Falini, B. Splenic B-cell lymphoma/leukaemia, unclassifiable. In: Swerdlow SH, NL.; Jaffe, ES.; Pileri, SA.; Stein, H.; Jurgen, T.; Vardiman,

- JW. (ed). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2008, pp 191-193.
173. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Salles G[et al.]. Splenic diffuse red pulp small-B cell lymphoma: toward the emergence of a new lymphoma entity. *Discovery medicine* 2012 Apr; **13**(71): 253-265.
174. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Callet-Bauchu E[et al.]. Hairy cell leukaemia-variant and splenic red pulp lymphoma: a single entity? *British journal of haematology* 2010 Jul; **150**(1): 113-116.
175. Sheibani K, Sohn CC, Burke JS[et al.]. Monocytoid B-cell lymphoma. A novel B-cell neoplasm. *The American journal of pathology* 1986 Aug; **124**(2): 310-318.
176. Cousar JB, McGinn DL, Glick AD[et al.]. Report of an unusual lymphoma arising from parafollicular B-lymphocytes (PBLs) or so-called "monocytoid" lymphocytes. *Am J Clin Pathol* 1987 Jan; **87**(1): 121-128.
177. Piris MA, Rivas C, Morente M[et al.]. Monocytoid B-cell lymphoma, a tumour related to the marginal zone. *Histopathology* 1988 Apr; **12**(4): 383-392.
178. Isaacson PGN, B.N.; Piris, M.A.; Berger, F.; Harris, N.L.; Müller-Hermelink, H.K; Swerdlow, S. Nodal marginal zone B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, H.; Vardiman, JW. (ed). *Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2001., pp 161.
179. Campo EP, SA.; Jaffe, ES.; Müller-Hermelink, HK.; Nathwani, BN. Nodal marginal zone lymphoma. In: Swerdlow SH, NL.; Jaffe, ES.; Pileri, SA.; Stein, H.; Jurgen, T.; Vardiman, JW. (ed). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2008, pp 218-219.
180. Arcaini L, Lucioni M, Boveri E[et al.]. Nodal marginal zone lymphoma: current knowledge and future directions of an heterogeneous disease. *Eur J Haematol* 2009 Sep; **83**(3): 165-174.
181. Boveri E, Arcaini L, Merli M[et al.]. Bone marrow histology in marginal zone B-cell lymphomas: correlation with clinical parameters and flow cytometry in 120 patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2009 Jan; **20**(1): 129-136.
182. Traverse-Glehen A, Bertoni F, Thieblemont C[et al.]. Nodal marginal zone B-cell lymphoma: a diagnostic and therapeutic dilemma. *Oncology (Williston Park, NY)* 2012 Jan; **26**(1): 92-99, 103-104.
183. Traverse-Glehen A, Felman P, Callet-Bauchu E[et al.]. A clinicopathological study of nodal marginal zone B-cell lymphoma. A report on 21 cases. *Histopathology* 2006 Jan; **48**(2): 162-173.
184. Inamdar KV, Medeiros LJ, Jorgensen JL[et al.]. Bone marrow involvement by marginal zone B-cell lymphomas of different types. *Am J Clin Pathol* 2008 May; **129**(5): 714-722.
185. Campo E, Miquel R, Krenacs L[et al.]. Primary nodal marginal zone lymphomas of splenic and MALT type. *Am J Surg Pathol* 1999 Jan; **23**(1): 59-68.
186. Camacho FI, Garcia JF, Sanchez-Verde L[et al.]. Unique phenotypic profile of monocytoid B cells: differences in comparison with the phenotypic profile observed in marginal zone B cells

- and so-called monocytoid B cell lymphoma. *The American journal of pathology* 2001 Apr; **158**(4): 1363-1369.
187. Dierlamm J, Pittaluga S, Wlodarska I[et al.]. Marginal zone B-cell lymphomas of different sites share similar cytogenetic and morphologic features. *Blood* 1996 Jan 1; **87**(1): 299-307.
188. Dierlamm J, Rosenberg C, Stul M[et al.]. Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in marginal zone B cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leukemia* 1997 May; **11**(5): 747-758.
189. Callet-Bauchu E, Baseggio L, Felman P[et al.]. Cytogenetic analysis delineates a spectrum of chromosomal changes that can distinguish non-MALT marginal zone B-cell lymphomas among mature B-cell entities: a description of 103 cases. *Leukemia* 2005 Oct; **19**(10): 1818-1823.
190. Rinaldi A, Mian M, Chigrinova E[et al.]. Genome-wide DNA profiling of marginal zone lymphomas identifies subtype-specific lesions with an impact on the clinical outcome. *Blood* 2011 Feb 3; **117**(5): 1595-1604.
191. Remstein ED, James CD, Kurtin PJ. Incidence and subtype specificity of API2-MALT1 fusion translocations in extranodal, nodal, and splenic marginal zone lymphomas. *The American journal of pathology* 2000 Apr; **156**(4): 1183-1188.
192. Arribas AJ, Campos-Martin Y, Gomez-Abad C[et al.]. Nodal marginal zone lymphoma: gene expression and miRNA profiling identify diagnostic markers and potential therapeutic targets. *Blood* 2012 Jan 19; **119**(3): e9-e21.
193. Tierens A, Delabie J, Pittaluga S[et al.]. Mutation analysis of the rearranged immunoglobulin heavy chain genes of marginal zone cell lymphomas indicates an origin from different marginal zone B lymphocyte subsets. *Blood* 1998 Apr 1; **91**(7): 2381-2386.
194. Miranda RN, Cousar JB, Hammer RD[et al.]. Somatic mutation analysis of IgH variable regions reveals that tumor cells of most parafollicular (monocytoid) B-cell lymphoma, splenic marginal zone B-cell lymphoma, and some hairy cell leukemia are composed of memory B lymphocytes. *Hum Pathol* 1999 Mar; **30**(3): 306-312.
195. Conconi A, Bertoni F, Pedrinis E[et al.]. Nodal marginal zone B-cell lymphomas may arise from different subsets of marginal zone B lymphocytes. *Blood* 2001 Aug 1; **98**(3): 781-786.
196. Camacho FI, Algara P, Mollejo M[et al.]. Nodal marginal zone lymphoma: a heterogeneous tumor: a comprehensive analysis of a series of 27 cases. *Am J Surg Pathol* 2003 Jun; **27**(6): 762-771.
197. Traverse-Glehen A, Davi F, Ben Simon E[et al.]. Analysis of VH genes in marginal zone lymphoma reveals marked heterogeneity between splenic and nodal tumors and suggests the existence of clonal selection. *Haematologica* 2005 Apr; **90**(4): 470-478.
198. Swerdlow SHB, F.; Pileri, S.A.; Harris, N. L.; Jaffe, E. S.; Stein, H. Lymphoplasmacytic lymphoma. In: Swerdlow SH, NL.; Jaffe, ES.; Pileri, SA.; Stein, H.; Jurgens, T.; Vardiman, JW. (ed). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2008, pp 194-195.
199. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV[et al.]. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002 Feb 21; **346**(8): 564-569.

200. Vitolo U, Ferreri AJ, Montoto S. Lymphoplasmacytic lymphoma-Waldenstrom's macroglobulinemia. *Critical reviews in oncology/hematology* 2008 Aug; **67**(2): 172-185.
201. Arber DA, George TI. Bone marrow biopsy involvement by non-Hodgkin's lymphoma: frequency of lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens. *Am J Surg Pathol* 2005 Dec; **29**(12): 1549-1557.
202. Morice WG, Chen D, Kurtin PJ[et al.]. Novel immunophenotypic features of marrow lymphoplasmacytic lymphoma and correlation with Waldenstrom's macroglobulinemia. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2009 Jun; **22**(6): 807-816.
203. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T[et al.]. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 2006 Nov 1; **108**(9): 3152-3160.
204. Mohamed AN, Bentley G, Bonnett ML[et al.]. Chromosome aberrations in a series of 120 multiple myeloma cases with abnormal karyotypes. *Am J Hematol* 2007 Dec; **82**(12): 1080-1087.
205. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A[et al.]. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000 Dec 28; **343**(26): 1910-1916.
206. Braggio E, Keats JJ, Leleu X[et al.]. Identification of copy number abnormalities and inactivating mutations in two negative regulators of nuclear factor-kappaB signaling pathways in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Cancer Res* 2009 Apr 15; **69**(8): 3579-3588.
207. Schop RF, Van Wier SA, Xu R[et al.]. 6q deletion discriminates Waldenstrom macroglobulinemia from IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Cancer Genet Cytogenet* 2006 Sep; **169**(2): 150-153.
208. Ocio EM, Schop RF, Gonzalez B[et al.]. 6q deletion in Waldenstrom macroglobulinemia is associated with features of adverse prognosis. *British journal of haematology* 2007 Jan; **136**(1): 80-86.
209. McMaster ML, Caporaso N. Waldenstrom macroglobulinaemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance: emerging understanding of a potential precursor condition. *British journal of haematology* 2007 Dec; **139**(5): 663-671.
210. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M[et al.]. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Sep 27; **102**(39): 13944-13949.
211. Kriangkum J, Taylor BJ, Treon SP[et al.]. Clonotypic IgM V/D/J sequence analysis in Waldenstrom macroglobulinemia suggests an unusual B-cell origin and an expansion of polyclonal B cells in peripheral blood. *Blood* 2004 Oct 1; **104**(7): 2134-2142.
212. Walsh SH, Laurell A, Sundstrom G[et al.]. Lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom's macroglobulinemia derives from an extensively hypermutated B cell that lacks ongoing somatic hypermutation. *Leuk Res* 2005 Jul; **29**(7): 729-734.
213. Martin-Jimenez P, Garcia-Sanz R, Balanzategui A[et al.]. Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenstrom's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2007 May; **92**(5): 635-642.

214. Martin-Jimenez P, Garcia-Sanz R, Sarasquete ME[et al.]. Functional class switch recombination may occur 'in vivo' in Waldenstrom macroglobulinaemia. *British journal of haematology* 2007 Jan; **136**(1): 114-116.
215. Babbage G, Townsend M, Zojer N[et al.]. IgM-expressing Waldenstrom's macroglobulinemia tumor cells reveal a potential for isotype switch events in vivo. *Leukemia* 2007 Apr; **21**(4): 827-830.
216. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ[et al.]. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986 Jun 12-18; **321**(6071): 674-679.
217. Chothia C, Lesk AM, Gherardi E[et al.]. Structural repertoire of the human VH segments. *Journal of molecular biology* 1992 Oct 5; **227**(3): 799-817.
218. Tomlinson IM, Cox JP, Gherardi E[et al.]. The structural repertoire of the human V kappa domain. *EMBO J* 1995 Sep 15; **14**(18): 4628-4638.
219. Williams SC, Frippiat JP, Tomlinson IM[et al.]. Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire. *Journal of molecular biology* 1996 Nov 29; **264**(2): 220-232.
220. Martin AC. Accessing the Kabat antibody sequence database by computer. *Proteins* 1996 May; **25**(1): 130-133.
221. Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P[et al.]. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *The Journal of experimental medicine* 1998 Dec 7; **188**(11): 2151-2162.
222. Schable KF, Zachau HG. The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 1993 Nov; **374**(11): 1001-1022.
223. Breusing-Kuppers J, Zocher I, Thiebe R[et al.]. The human immunoglobulin kappa locus on yeast artificial chromosomes (YACs). *Gene* 1997 Jun 3; **191**(2): 173-181.
224. Kawasaki K, Minoshima S, Nakato E[et al.]. Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the Vkappa genes. *European journal of immunology* 2001 Apr; **31**(4): 1017-1028.
225. Giudicelli V, Chaume D, Lefranc MP. IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res* 2005 Jan 1; **33**(Database issue): D256-261.
226. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 2008 Jul 1; **36**(Web Server issue): W503-508.
227. Satow Y, Cohen GH, Padlan EA[et al.]. Phosphocholine binding immunoglobulin Fab McPC603. An X-ray diffraction study at 2.7 Å. *Journal of molecular biology* 1986 Aug 20; **190**(4): 593-604.
228. Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *Journal of molecular biology* 1987 Aug 20; **196**(4): 901-917.
229. Giudicelli V. Systèmes d'information, Ontologies, Bases de connaissances. [pdf]. Date d'édition: IMGT. Date de dernière mise à jour, date d'accès: 15/12/12. Disponible sur: http://www.imgt.org/IMGTeducation/Enseignements/_FR/archives/FMBS312_Ontologies_29_0908.pdf.

230. Giudicelli V, Chaume D, Lefranc MP. IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. *Nucleic Acids Res* 2004 Jul 1; **32**(Web Server issue): W435-440.
231. Yousfi Monod M, Giudicelli V, Chaume D[et al.]. IMGT/JunctionAnalysis: the first tool for the analysis of the immunoglobulin and T cell receptor complex V-J and V-D-J JUNCTIONS. *Bioinformatics* 2004 Aug 4; **20 Suppl 1**: i379-385.
232. Lane BS, Mensah AA, Lin K[et al.]. Analysis of VH gene sequences using two web-based immunogenetics resources gives different results, but the affinity maturation status of chronic lymphocytic leukaemia clones as assessed from either of the resulting data sets has no prognostic significance. *Leukemia* 2005 May; **19**(5): 741-749.
233. Davi F, Rosenquist R, Ghia P[et al.]. Determination of IGHV gene mutational status in chronic lymphocytic leukemia: bioinformatics advances meet clinical needs. *Leukemia* 2008 Jan; **22**(1): 212-214.
234. Pommie C, Levadoux S, Sabatier R[et al.]. IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties. *Journal of molecular recognition : JMR* 2004 Jan-Feb; **17**(1): 17-32.
235. Chang B, Casali P. The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunology today* 1994 Aug; **15**(8): 367-373.
236. Lossos IS, Tibshirani R, Narasimhan B[et al.]. The inference of antigen selection on Ig genes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2000 Nov 1; **165**(9): 5122-5126.
237. Berger F, Traverse-Glehen A, Felman P[et al.]. Clinicopathologic features of Waldenstrom's macroglobulinemia and marginal zone lymphoma: are they distinct or the same entity? *Clinical lymphoma* 2005 Mar; **5**(4): 220-224.
238. Pangalis GA, Kyrtsolis MC, Kontopidou FN[et al.]. Differential diagnosis of Waldenstrom's macroglobulinemia and other B-cell disorders. *Clinical lymphoma* 2005 Mar; **5**(4): 235-240.
239. Pangalis GA, Kyrtsolis MC, Kontopidou FN[et al.]. Differential diagnosis of Waldenstrom's macroglobulinemia from other low-grade B-cell lymphoproliferative disorders. *Seminars in oncology* 2003 Apr; **30**(2): 201-205.
240. Berger FI, P.G.; Piris, M.A.; Harris, N.L.; Muller-Hermelink, H.K.; Nathwani, B.N.; Swerdlow, S.H. Lymphoplasmacytic lymphoma / Waldenström macroglobulinemia. In: Jaffe ES, H.; Vardiman, JW. (ed). *Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2001., pp 132-134.
241. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 1998 Aug; **16**(8): 2780-2795.
242. Nathwani BN, Anderson JR, Armitage JO[et al.]. Marginal zone B-cell lymphoma: A clinical comparison of nodal and mucosa-associated lymphoid tissue types. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 1999 Aug; **17**(8): 2486-2492.
243. Mollejo M, Camacho FI, Algara P[et al.]. Nodal and splenic marginal zone B cell lymphomas. *Hematological oncology* 2005 Sep-Dec; **23**(3-4): 108-118.

244. Salama ME, Lossos IS, Warnke RA[et al.]. Immunoarchitectural patterns in nodal marginal zone B-cell lymphoma: a study of 51 cases. *Am J Clin Pathol* 2009 Jul; **132**(1): 39-49.
245. Ngo VN, Young RM, Schmitz R[et al.]. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011 Feb 3; **470**(7332): 115-119.
246. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010 Jan 15; **327**(5963): 291-295.
247. Jiang Z, Georgel P, Li C[et al.]. Details of Toll-like receptor:adapter interaction revealed by germ-line mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Jul 18; **103**(29): 10961-10966.
248. Xu L SA, Arcaini L, Hunter Z, Yang G, Zhou Y, et al. A somatic variant in MYD88 (L265P) revealed by whole genome sequencing differentiates lymphoplasmacytic lymphoma from marginal zone lymphomas. *Blood*, ed. American Society of Hematology Annual Meeting 2011: 118;(abstract[261]).
249. Treon SP XL, Zhou Y, Liu X, Yang G, Cao Y, Hanzis C, Sheehy P, Manning R, Patterson CJ, Laramie JM, Skifter DA, Lincoln SE, and Hunter Z. Whole Genome Sequencing Reveals a Widely Expressed Mutation (MYD88 L265P) with Oncogenic Activity in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Blood*, ed. American Society of Hematology Annual Meeting 2011: 118;(abstract[300]).
250. Yan Q, Huang Y, Watkins AJ[et al.]. BCR and TLR signaling pathways are recurrently targeted by genetic changes in splenic marginal zone lymphomas. *Haematologica* 2012 Apr; **97**(4): 595-598.
251. Silberstein LE, George A, Durdik JM[et al.]. The V4-34 encoded anti-i autoantibodies recognize a large subset of human and mouse B-cells. *Blood cells, molecules & diseases* 1996; **22**(2): 126-138.
252. Cappione AJ, Pugh-Bernard AE, Anolik JH[et al.]. Lupus IgG VH4.34 antibodies bind to a 220-kDa glycoform of CD45/B220 on the surface of human B lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2004 Apr 1; **172**(7): 4298-4307.
253. Grillot-Courvalin C, Brouet JC, Piller F[et al.]. An anti-B cell autoantibody from Wiskott-Aldrich syndrome which recognizes i blood group specificity on normal human B cells. *European journal of immunology* 1992 Jul; **22**(7): 1781-1788.
254. Sun Y, Park MK, Kim J[et al.]. Repertoire of human antibodies against the polysaccharide capsule of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. *Infection and immunity* 1999 Mar; **67**(3): 1172-1179.
255. Liu L, Lucas AH. IGH V3-23*01 and its allele V3-23*03 differ in their capacity to form the canonical human antibody combining site specific for the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *Immunogenetics* 2003 Aug; **55**(5): 336-338.
256. Costea N, Yakulis VJ, Heller P. Inhibition of cold agglutinins (anti-I) by *M. pneumoniae* antigens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 1972 Feb; **139**(2): 476-479.
257. Koshiol J, Gridley G, Engels EA[et al.]. Chronic immune stimulation and subsequent Waldenstrom macroglobulinemia. *Arch Intern Med* 2008 Sep 22; **168**(17): 1903-1909.

258. Kristinsson SY, Koshiol J, Bjorkholm M[et al.]. Immune-related and inflammatory conditions and risk of lymphoplasmacytic lymphoma or Waldenstrom macroglobulinemia. *Journal of the National Cancer Institute* 2010 Apr 21; **102**(8): 557-567.
259. Kristinsson SY, Landgren O. What causes Waldenstrom's macroglobulinemia: genetic or immune-related factors, or a combination? *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* 2011 Feb; **11**(1): 85-87.
260. Dong HY, Shahsafaei A, Dorfman DM. CD148 and CD27 are expressed in B cell lymphomas derived from both memory and naive B cells. *Leukemia & lymphoma* 2002 Sep; **43**(9): 1855-1858.
261. Duvvuri B, Wu GE. Gene Conversion-Like Events in the Diversification of Human Rearranged IGHV3-23*01 Gene Sequences. *Frontiers in immunology* 2012; **3**: 158.
262. Chanudet E, Huang Y, Ichimura K[et al.]. A20 is targeted by promoter methylation, deletion and inactivating mutation in MALT lymphoma. *Leukemia* 2010 Feb; **24**(2): 483-487.
263. Bi Y, Zeng N, Chanudet E[et al.]. A20 inactivation in ocular adnexal MALT lymphoma. *Haematologica* 2012 Jun; **97**(6): 926-930.
264. Puente XS, Pinyol M, Quesada V[et al.]. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011 Jul 7; **475**(7354): 101-105.
265. Landgren O, Staudt L. MYD88 L265P somatic mutation in IgM MGUS. *N Engl J Med* 2012 Dec 6; **367**(23): 2255-2256; author reply 2256-2257.
266. Petit B, Chaury MP, Le Clorennec C[et al.]. Indolent lymphoplasmacytic and marginal zone B-cell lymphomas: absence of both IRF4 and Ki67 expression identifies a better prognosis subgroup. *Haematologica* 2005 Feb; **90**(2): 200-206.
267. Rossi D, Deaglio S, Dominguez-Sola D[et al.]. Alteration of BIRC3 and multiple other NF-kappaB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 2011 Nov 3; **118**(18): 4930-4934.
268. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M[et al.]. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *The Journal of experimental medicine* 2012 Aug 27; **209**(9): 1537-1551.

Annexes

Annexe 1 : Table répertoriant les lymphomes présentant des remaniements des gènes des immunoglobulines dans plus de 5% des cas

Les nombres en parenthèse correspondent aux pourcentages de cas présentant l'anomalie

Type de lymphomes	Translocations	Mutations de gènes suppresseurs de tumeur	Virus	Autres anomalies
Lymphome du manteau	<i>CCND1-IgH</i> (95)	<i>ATM</i> (40)	–	Délétion 13q14 (50–70)
Lymphome folliculaire	<i>BCL2-IgH</i> (90)	–	–	–
Lymphome B diffus à grandes cellules	<i>BCL6</i> –partenaires variés (35) <i>BCL2-IgH</i> (15-30) <i>MYC-IgH</i> ou <i>MYC-IgL</i> (15)	<i>CD95</i> (10–20) – <i>ATM</i> (15) <i>TP53</i> (25)(50)	–	Mutations de multiples oncogènes
Lymphome de Burkitt	<i>MYC-IgH</i> ou <i>MYC-IgL</i> (100)	<i>TP53</i> (40), <i>RB2</i> (20–80)	EBV (cas endémiques : 95; sporadiques : 30)	–
Lymphomes du MALT	MALT <i>API2-MALT1</i> (30) <i>BCL10-IgH</i> (5) <i>MALT1-IgH</i> (15-20) <i>FOXP1-IgH</i> (10)	<i>CD95</i> (5-80)	Implication d' <i>Helicobacter pylori</i> dans les lymphomes du MALT gastrique	
Lymphome lymphoplasmocytaire	<i>PAX5-IgH</i> (50)	–	–	–
Multiple myeloma	<i>CCND1-IgH</i> (15-20) <i>FGFR3-IgH</i> (10) <i>MAF-IgH</i> (5-10)	<i>CD95</i> (10)	–	Altérations de <i>MYC</i> (40), mutations de <i>RAS</i> (40), délétion 13q14(50)

Annexe 2 : Calcul du score de Matutes

Marqueurs membranaires	Points attribués	
	1 point	0 point
Ig de membrane	faible intensité	Intensité moyenne à forte
CD 5	+	–
CD 23	+	–
CD 79b ou CD22	faible ou négatif	Moyen ou fort
FMC 7	–	+

Le score de Matutes est calculé à partir du résultat de l'immunophénotypage tumoral (156, 157). Il peut varier entre 0 et 5. Un score supérieur ou égal à 4 est en faveur du diagnostic d'une leucémie lymphoïde chronique.

Table des matières

<i>Préambule</i>	1
<i>Chapitre 1 : Physiologie de la différenciation lymphocytaire B et des remaniements des gènes des immunoglobulines</i>	3
Physiologie de la maturation des gènes des immunoglobulines de la réponse immune B ...	4
1. Généralités sur les immunoglobulines humaines	4
1.1. La protéine immunoglobuline	4
1.2 Organisation des gènes des immunoglobulines chez l'homme	6
1.2.1 Organisation des gènes de la chaîne kappa	7
1.2.2 Organisation des gènes de la chaîne lambda	8
1.2.3 Organisation des gènes de la chaîne lourde	8
2. Réarrangement des gènes des immunoglobulines dans la moelle osseuse	10
2.1. Le réarrangement VJ et VDJ et la diversité des immunoglobulines	10
2.2 Différenciation lymphocytaire B intra médullaire chez l'humain	16
2.3 Exclusion allélique	18
2.4 Correction du BCR (Editing ou réarrangements secondaires)	20
3. La transduction de signal via le BCR, et les principaux co-sigaux associés à la maturation B post-médullaire	23
4. Maturation lymphocytaire B post-médullaire	26
4.1 Les organes lymphoïdes secondaires	26
4.1.1 Les Ganglions lymphatiques	26
4.1.2 La rate	28
4.1.3 Le tissu lymphoïde associé aux muqueuses	29
4.1.4 Les amygdales	30
4.2 Les compartiments cellulaires	31
4.2.1 Les cellules B transitionnelles	31
4.2.2 Les cellules B naïves folliculaires	31
4.2.3 Les cellules B du centre germinatif	33
4.2.3.1 Le processus d'hypermutation somatique	37
4.2.3.2 La commutation de classe	39
4.2.4 Les lymphocytes B mémoires	42
4.2.5 Les cellules B sanguines et leur répertoire IGHV	44
4.2.6 Les cellules de la zone marginale	46
<i>Chapitre 2 : Relation entre altérations des gènes des immunoglobulines et lymphomagénèse B</i>	47
Accident de recombinaison des gènes des immunoglobulines, dérégulation et mutations d'oncogènes et lymphomes B périphériques	48
Le Répertoire <i>IGHV</i> dans les lymphomes	54
1. L'exemple de la LLC	54
2. L'exemple du LNH du manteau	58
3. L'exemple des lymphomes du MALT	59
4. L'exemple de l'infection par le VHC	60

<i>Chapitre 3 : les lymphomes de la zone marginale non MALT et le lymphome lymphoplasmocytaire/maladie de Waldenström</i>	64
Les lymphomes spléniques de la zone marginale	65
Epidémiologie	65
Présentation clinique	65
Diagnostic.....	66
Cytologie sanguine.....	67
Immunophénotype sanguin ou médullaire	67
Myélogramme	68
Biopsie ostéo-médullaire.....	68
Histologie splénique.....	69
Cytogénétique et anomalies moléculaires	70
Le statut mutationnel de la région variable des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobuline (<i>IGHV</i>).....	72
Diagnostic différentiel.....	74
Les lymphomes ganglionnaires de la zone marginale.....	76
Epidémiologie	76
Présentation clinique	76
Histologie ganglionnaire et médullaire	77
Immunophénotype.....	78
Cytogénétique et anomalies moléculaires	78
Le statut mutationnel des <i>IGHV</i>	80
Lymphome lymphoplasmocytaire / maladie de Waldenström.....	81
Epidémiologie	81
Présentation clinique	81
Hémogramme.....	83
Biopsie ostéomédullaire et myélogramme	83
Atteintes extra-médullaires	84
Immunophénotype et Immunohistochimie.....	85
Cytogénétique et anomalies moléculaires	85
Le statut mutationnel des <i>IGHV</i>	87
<i>Chapitre 4 : Objectifs du travail</i>	88
<i>Chapitre 5 : Méthodologie utilisée pour l'analyse des séquences IGHV humaines</i>	90
Extraction des acides nucléiques.....	91
Amplification	92
Séquençage.....	93
Analyse de séquences.....	94
Les bases de données.....	94
Méthodologie d'analyse	96
<i>Chapitre 6 : Les articles de la thèse</i>	99
Publication N°1 : Splenic marginal zone lymphomas and lymphoplasmacytic lymphomas originate from B-cell compartments with two antigen exposure histories (2008).....	100
Contexte	100
Question posée	102
Résumé.....	102
Article 103	
Discussion de l'article	107
Publication N°2 : <i>IGHV</i> gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenström Macroglobulinemia / lymphoplasmacytic lymphomas	109

Contexte	109
Question posée	111
Résumé	111
Article 113	
Discussion de l'article	119
<i>Chapitre 7 : Discussion</i>	124
Les caractéristiques cliniques cardinales de ces quatre lymphomes	125
La place de la stimulation à l'antigène dans les SMZL et les WM/LPL.	126
L'origine cellulaire des SMZL, des LPL/WM et des NMZL	128
<i>Activation NF-kappa B et lymphomes B</i>	130
<i>Chapitre 8 : Conclusion et perspectives</i>	132
<i>Bibliographie</i>	135
<i>Annexes</i>	154
Annexe 1 : Table répertoriant les lymphomes présentant des remaniements des gènes des immunoglobulines dans plus de 5% des cas	155
Annexe 2 : Calcul du score de Matutes	157

Table des illustrations

Figure 1 : représentation schématique d'une IgG1 humaine.....	4
Figure 2 : Structure des domaines d'immunoglobulines constants et variables	5
Figure 3 : représentation schématique du locus des chaînes kappa	7
Figure 4 : représentation d'un gène IGKV :.....	7
Figure 5 : exemple de la séquence <i>IGKV1-5</i>	8
Figure 6 : représentation schématique du locus IG lambda	8
Figure 7 : représentation schématique du locus des chaînes lourdes d'immunoglobuline.	9
Figure 8 : Réarrangement VDJ du locus des chaînes lourdes et VJ des chaînes légères	11
Figure 9 : séquence VDJ de l'IGH tumorale d'un SMZL de notre série publiée	12
Figure 10 : Mécanisme du réarrangement à partir des motifs heptamériques et nonamériques	13
Figure 11 : le mécanisme de recombinaison	15
Figure 12 : les différents stades de développement du lymphocyte B.	17
Figure 13 : le pré-BCR.....	18
Figure 14 : dynamique des réarrangements des gènes des immunoglobulines et exclusion allélique.	19
Figure 15 : réarrangement de la chaîne lourde chez l'homme et la souris.....	21
Figure 16 : réarrangements de la chaîne légère chez la souris :.....	22
Figure 17 : activation de la voie classique de NF-kappa B par le BCR.....	23
Figure 18 : coopération entre les cellules dendritiques présentatrices de l'antigène, les cellules T CD4 auxiliaires et les lymphocytes B.....	24
Figure 19 : voie de transduction du CD40	24
Figure 20 : signalisation par les TLR. Source : texte et légende d'après (49)	25
Figure 21 : coupe d'un ganglion lymphatique.	27
Figure 22 : histologie d'un follicule lymphoïde secondaire.....	28
Figure 23 : représentation schématique de la structure de la rate	29
Figure 24 : anatomie des amygdales	30
Figure 25 : immunomarquage CD4 sur coupe de ganglion lymphatique avec hyperplasie folliculaire	32
Figure 26 : Les 4 microenvironnements de la réponse immune extrafolliculaire.....	33
Figure 27 : immunomarquage CD23 sur coupe de ganglion lymphatique avec hyperplasie folliculaire	34
Figure 28 : marquage Ki67 (marqueur de prolifération) sur coupe de ganglion lymphatique avec hyperplasie folliculaire :	35
Figure 29 : représentation de la maturation T dépendante des lymphocytes folliculaires au travers du centre germinatif.....	36
Figure 30 : rôle des facteurs transcriptionnels Bcl6, Blimp1, Pax5 et XBP1 dans la différenciation lymphocytaire B post-centre germinatif	37
Figure 31 : les différents mécanismes de réparation mis en jeu après action de AID	39
Figure 32 : mécanisme de commutation isotypique.....	41
Figure 33 : représentation schématique des différentes populations mémoires B circulantes.	46
Figure 34 : les partenaires d'IGH impliqués dans des remaniements chromosomiques.....	50
Figure 35 : les réarrangements impliquant <i>C-MYC</i> et <i>IGH</i> dans le lymphome de Burkitt	52
Figure 36 : fréquences de mutations de AID sur ces gènes cibles chez la souris présentant un double Knockout <i>MSH2^{-/-}</i> et <i>UNG^{-/-}</i>	53
Figure 37 : représentation du répertoire IGHV de la LLC en 2012	55
Figure 38 : exemples de CDR3 issus des <i>IGHV3-21</i> de cas de LLC.	56

Figure 39 : représentation du répertoire IGHV dans le lymphome du manteau	59
Figure 40 : lymphocytes villeux circulants	67
Figure 41 : biopsie ostéomédullaire de SMZL	69
Figure 42 : histologie splénique dans un SMZL	70
Figure 43 : biopsie ganglionnaire de NMZL.....	77
Figure 44 : biopsie ostéomédullaire de LPL/WM.....	84
Figure 45 : annotation d'une région variable selon IMGT.....	95
Figure 46 : représentation schématique de la protéine Myd88 et ses mutations actrices.....	110
Figure 47 : fréquence de répartition des gènes IGHV selon le sous type lymphocytaire B...	120
Figure 48 : arbre décisionnel diagnostique des cas disséminés de MZL et LPL/WM.....	123

Table des tableaux

Tableau 1 : principales caractéristiques du motif canonique impliquant l' <i>IGHV1-2*04</i> de différentes séries de patients issues de la littérature et de notre travail.....	73
Tableau 2 : récapitulatif de l'étude des <i>IGHV</i> dans les différentes séries de NMZL.....	80

Résumé :

Le locus des chaînes lourdes des immunoglobulines est une structure génétique complexe qui subit de nombreux remaniements géniques au cours de la maturation B mais aussi au cours des modèles tumoraux que sont les lymphomes B.

Les lymphomes de la zone marginale (MZL) comportent 3 sous-types selon le territoire infiltré : les lymphomes spléniques de la zone marginale (SMZL), les lymphomes ganglionnaires de la zone marginale (NMZL) et les lymphomes des tissus lymphoïdes liés aux muqueuses ou lymphomes de MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue). Les MZL partagent parfois des caractéristiques communes avec le lymphome lymphoplasmocytaire/maladie de Waldenström (LPL/WM).

Notre travail a consisté en l'étude du réarrangement génique de la chaîne lourde de l'immunoglobuline des MZL et du LPL/WM. Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse génétique sur des prélèvements médullaires de 11 cas de SMZL et 14 cas de LPL/WM. Le répertoire *IGHV*, les profils mutationnels et l'analyse des HCDR3 ont prouvé qu'il s'agissait de deux maladies distinctes provenant de deux compartiments cellulaires ayant des expositions à l'antigène différentes.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué une comparaison des profils *IGHV* et une recherche de la mutation *MYD88* L265P pour 92 MZL et 31 cas LPL/WM, à partir de matériel tumoral issu du territoire initial d'infiltration. Nous avons montré que les SMZL, NMZL et LPL/WM sont des entités distinctes ayant des histoires d'exposition antigénique différentes et que la mutation L265P de *MYD88* est fortement associée au diagnostic de LPL/WM. Nous avons mis en évidence des critères génétiques *IGHV* spécifiques pour chacun d'entre eux. Enfin, nous proposons des clés diagnostiques non ambiguës pour ces lymphomes.

Nous discutons l'hypothèse d'une stimulation antigénique chronique dans la survenue de ces lymphomes dans un modèle d'infection chronique en rapport étroit avec le contexte auto-immun ainsi que l'origine cellulaire des SMZL, NMZL et LPL/WM.

Les perspectives de ce travail sont d'étudier les voies de signalisation impliquées dans la physiopathologie de ces lymphomes.

Mots clés : Lymphomes de la zone marginale, lymphomes lymphoplasmocytaire, *IGHV*, *MYD88*

Molecular and phenotypic study of zone marginal lymphoma and Waldenström macroglobulinemia

Abstract : The immunoglobulin heavy chain locus (IgH) is a complex genetic structure that undergoes many genetic recombinations during B cell maturation and B cell lymphomas. Marginal zone lymphomas (MZL) are B cell neoplasms with common morphologic and pathogenic features. Three distinct subtypes are described, based on the primary infiltrated organ: splenic MZL (SMZL), nodal MZL (NMZL) and extranodal MZL of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). MZLs share common characteristics with lymphoplasmacytic lymphoma (LPL).

Here, we analysed the *IGHV* gene repertoire consisting in determination of *IGHV* usage, somatic mutation pattern, distribution of mutations and analysis of VDJ junction. We, first, compared 11 cases of SMZL and 14 cases of LPL/WM on homogeneous material consisting of infiltrated bone marrow trephine biopsies. In a second step, we performed a retrospective analysis of *IGHV* gene sequences and identified the occurrence of *MYD88* L265P mutations from MZLs and 31 LPL/WMs from tumor material of initial infiltration. We highlighted specific genetic criteria for SMZL, NMZL and LPL/WM. Altogether, we showed that SMZLs, NMZLs, and LPL/WM are distinct entities with different antigen exposure histories and that the *MYD88* L265P mutation is nearly restricted to LPL/WMs. We evidenced the specific features of the *IGHV* gene repertoire of each of these three entities. We also proposed unambiguous diagnosis keys for these lymphomas.

We discuss the hypothesis role a continuous antigenic stimulation as a important player in the occurrence of these tumours. We also discuss their relationship with autoimmunity and speculate on their normal counterpart.

Future directions of this work would be to focus on the NF-kappa B signaling pathways involved in the emergence of the clonal transformed B cells.

Keywords : marginal zone lymphoma, lymphoplasmacytic lymphoma, *MYD88*, *IGHV*