



Université Lille 2
Droit et Santé

UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2015

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Recherche des mutations de *CD79A/B*, *CXCR4*, *MYD88* et *KLF2* dans les
Lymphomes de la Zone Marginale indolents et transformés**

Présentée et soutenue publiquement le 23 Juin 2015 à 14h00
au Pôle Formation

Par Eileen Mary Boyle

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Thierry FACON

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME

Mademoiselle le Docteur Stéphanie POULAIN

Directeur de Thèse :

Monsieur le Professeur Franck MORSCHHAUSER

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| RESUME | 9 |
| INTRODUCTION | 11 |
| I. Le lymphome de la zone marginale | 13 |
| A. Epidémiologie | 13 |
| 1. Incidence du lymphome de la zone marginale..... | 13 |
| 2. Incidence du lymphome de la zone marginale..... | 15 |
| B. Anatomopathologie | 16 |
| 1. Le lymphome du MALT | 16 |
| 2. Le lymphome de la zone marginale splénique..... | 17 |
| 3. Le lymphome de la zone marginale ganglionnaire..... | 18 |
| C. Génétique des lymphomes de la zone marginale | 19 |
| 1. Cytogénétique conventionnelle..... | 19 |
| 2. Réarrangement de l' <i>IGH</i> | 20 |
| 3. Mutations | 20 |
| a) La voie de signalisation NOTCH2 | 20 |
| b) La voie de signalisation NF- κ B | 22 |
| c) <i>KLF2</i> | 24 |
| d) Autres | 25 |
| II. La transformation de lymphome de la zone marginale | 26 |
| A. Incidence..... | 26 |
| B. Anomalies Morphologiques | 26 |
| C. Anomalies Génétiques | 27 |
| D. Anomalies épigénétiques | 28 |
| III. Objectif | 28 |
| MATERIELS ET METHODES | 30 |
| I. Phase préanalytique | 30 |
| II. Séquençage Sanger | 31 |
| A. Principe | 31 |
| B. Régions d'intérêt pour <i>CD79A/B</i> et <i>CXCR4</i> | 33 |
| C. Mise au point de <i>KLF2</i> | 34 |
| D. PCR quantitative et mise en évidence de la L265P de <i>MYD88</i> | 36 |
| III. Séquençage de nouvelle génération..... | 36 |
| RESULTATS | 39 |
| I. Données démographiques..... | 39 |
| II. Répartition des mutations dans les lymphomes de la zone marginale | 40 |
| III. Répartition des mutations dans les formes transformées | 44 |
| A. Sanger | 44 |
| B. Séquençage de nouvelle génération..... | 45 |
| DISCUSSION | 51 |
| I. Mutations de <i>KLF2</i> | 51 |
| II. Rechute et mutation..... | 52 |
| III. Transformation et mutation | 52 |
| A. Double hit NF- κ B et transformation? | 52 |
| B. <i>MYD88</i> et transformation | 53 |
| C. <i>CXCR4</i> et transformation | 54 |
| D. <i>TP53</i> et transformation..... | 55 |
| CONCLUSION | 57 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 58 |

RESUME

Contexte : Le lymphome de la zone marginale est une hémopathie lymphoïde mature caractérisée par son profil indolent et ses rechutes fréquentes. Dans moins de 10% des cas, ces lymphomes indolents évoluent et se transforment en lymphome de haut grade de malignité. Les mécanismes de progressions et de transformations sont à ce jour mal connus. L'objectif de ce travail est de décrire un panel de mutations habituellement décrit dans les lymphomes B mature et de suivre son évolution au cours de la rechute et de la transformation.

Méthode : De l'ADN de 46 patients ont été extraits à partir de prélèvement d'anatomopathologie fixés. Pour quatorze d'entre eux nous disposons de prélèvements séquentiels obtenus lors de différentes rechutes. Pour quatre patients complémentaires, nous disposons, en plus du prélèvement « indolent » d'un prélèvement de la forme transformée. *CXCR4*, *CD79A/B* et la région 3' de *KLF2* ont été séquencé par la méthode de Sanger et la mutation L265P de *MYD88* recherchée par PCR quantitative. Une analyse complémentaire, sur trois couples d'échantillons pour lesquels nous disposons d'un échantillon de la tumeur indolente et transformée, a été réalisée par le séquençage d'un panel Ampliseq® de gènes lymphoïdes.

Résultats : Parmi les prélèvements séquentiels, aucune nouvelle mutation de *CD79A/B*, *MYD88* ou *CXCR4* n'a été mise en évidence. Nous avons mis en évidence des évolutions clonales entre les prélèvements transformés et indolents par l'acquisition d'une mutation de *CD79B*. De manière intéressante, les autres mutations (*MYD88*, *CXCR4*, *TP53*) étaient déjà présentes dans les formes indolentes suggérant qu'elles pourraient

constituer en soit des facteurs de risque de transformation plutôt que d'authentiques facteurs de transformation.

INTRODUCTION

La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé des hémopathies malignes de 2008 reconnaît- sous l'appellation lymphome de la zone marginale (MZL)- trois entités clinico-morphologiques distinctes : les lymphomes de la zone marginale ganglionnaires, les lymphomes de la zone marginale spléniques et les lymphomes des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) (1).

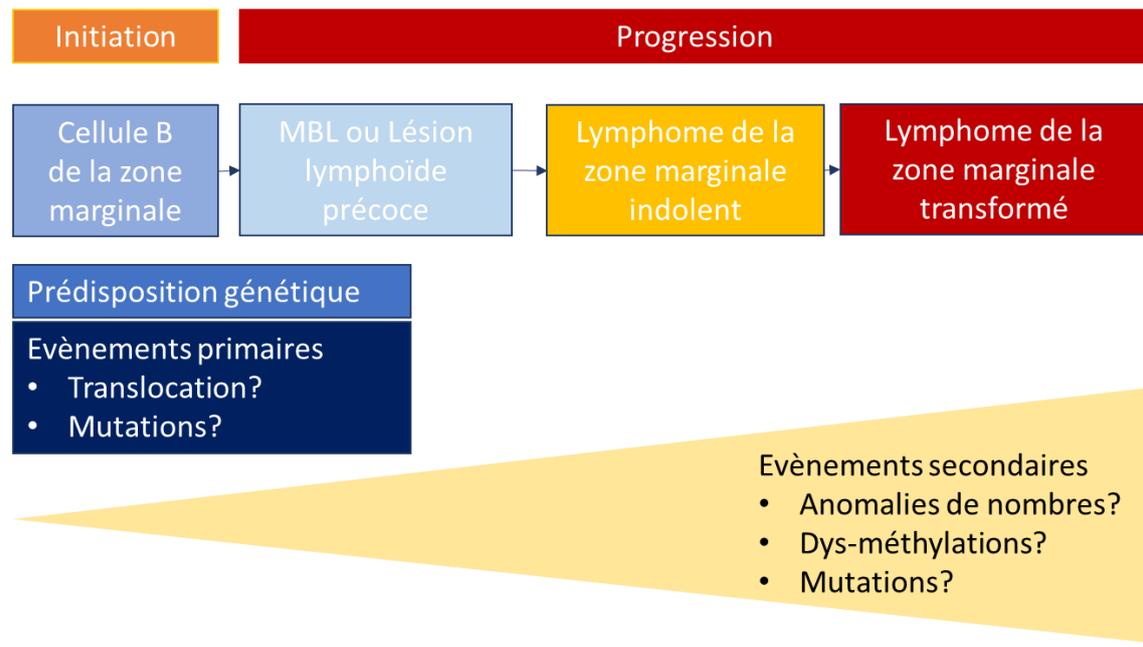
Notre compréhension des hémopathies lymphoïdes matures est basée sur un modèle où une cellule tumorale, sur un lit de prédisposition génétique, acquiert un évènement initiateur (telle qu'une translocation, une anomalie du nombre de chromosome, ou une mutation) et progresse à travers les différents stades de la maladie par l'acquisition séquentielle d'un certain nombre d'autres évènements génétiques (mutations, anomalies du nombre de chromosome) ou de modifications épigénétiques (méthylation).

Si ce phénomène est bien décrit dans le lymphome folliculaire (2,3) ou le myélome (4), il n'y a à ce jour que très peu de données concernant ce processus dans le lymphome de la zone marginale.

Les études de GWAS (Genome Wide Association Studies) ont commencées à identifier des facteurs de prédisposition génétique au lymphome de la zone marginale tel que le *HLA-B* (rs 2911994) et le *BTNL2* (rs 9461741) (5). Par ailleurs, des travaux récents ont ébauché la description d'une entité précurseur du lymphome de la zone marginale splénique, la lymphocytose B-clonale de phénotype marginale (MBL) (6). Pour les formes ganglionnaires ou associées aux muqueuses on parle de lésions lymphoïdes précoces. Décrites initialement en pédiatrie, elles sont de faible risque évolutif (7). A l'autre extrême,

les formes transformées, de haut grade de malignité, bien que rares, sont quant à elle bien décrites depuis de nombreuses années (revue par (8)), **Figure 1**.

Figure 1 : Evolution clonale dans le lymphome de la zone marginale (MZL).
 Sous l'influence de facteurs cellulaires ou environnementaux, une cellule précurseur acquiert une anomalie génétique initiatrice (translocation, mutation...) suivi de l'apparition d'anomalies séquentielles conduisant à une progression tumorale et éventuellement une transformation. (MBL : lymphocytose B-monoclonale)



Les mécanismes de progression et de transformation sont à ce jour mal connus. L'objectif de ce travail est de décrire un panel de mutation habituellement décrit dans les lymphomes B mature et de suivre son évolution au cours de la transformation.

I. Le lymphome de la zone marginale

A. Epidémiologie

1. Incidence du lymphome de la zone marginale

Incidence du lymphome de la zone marginale: En 2012, en France, on estime à 1.772 le nombre de nouveaux cas de lymphome de la zone marginale. L'incidence standardisée sur la population mondiale est de 1,5 pour 100.000 chez l'homme et de 1,2 pour 100.000 chez la femme, correspondant à un rapport Hommes/Femmes de 1,25. L'incidence du lymphome de la zone marginale augmente avec l'âge, passant chez l'homme de 1,2/100.000 entre 40-44 ans à 13,5/100.000 entre 85-89 ans et chez la femme de 0,7/100.000 entre 40-44 ans à 12,2/100.000 entre 85-89 ans, **Figure 2**. L'âge médian au diagnostic est de 70 ans pour les hommes et de 74 ans chez la femme. Plus de 42% des patients sont âgés de plus de 75 ans (37 % chez l'homme, 48 % chez la femme) (9).

Le nombre de cas incidents est en augmentation. En France, cette augmentation est de 71% chez l'homme et 88% chez la femme entre 2003 et 2012. Le taux d'incidence standardisée augmente de 4,4% par an chez l'homme et de 3,6% par an chez la femme, pour cette même période **Figure 3**.

Figure 2 : Incidence des lymphomes de la zone marginale en France chez l'homme (bleu) et chez la femme (rouge).

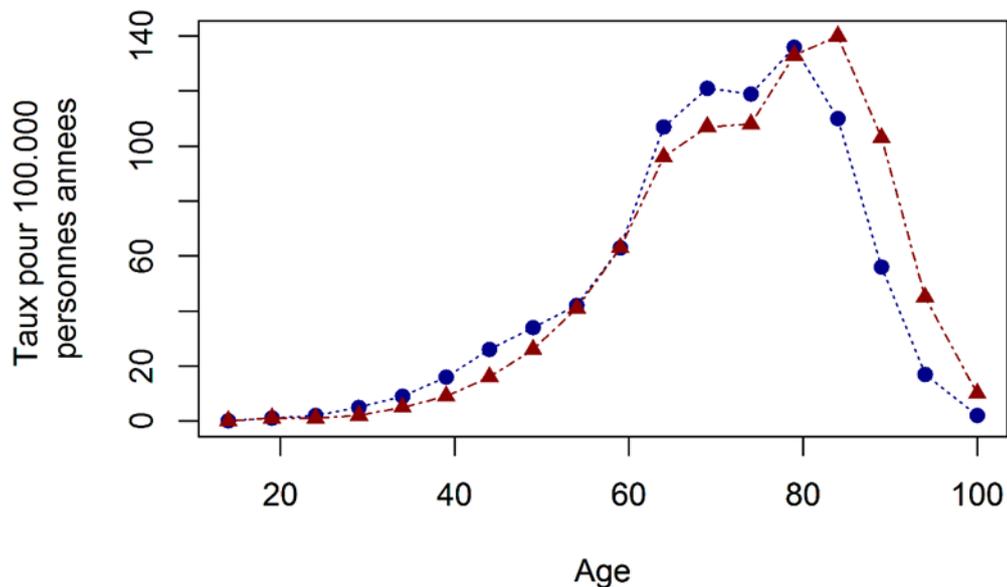
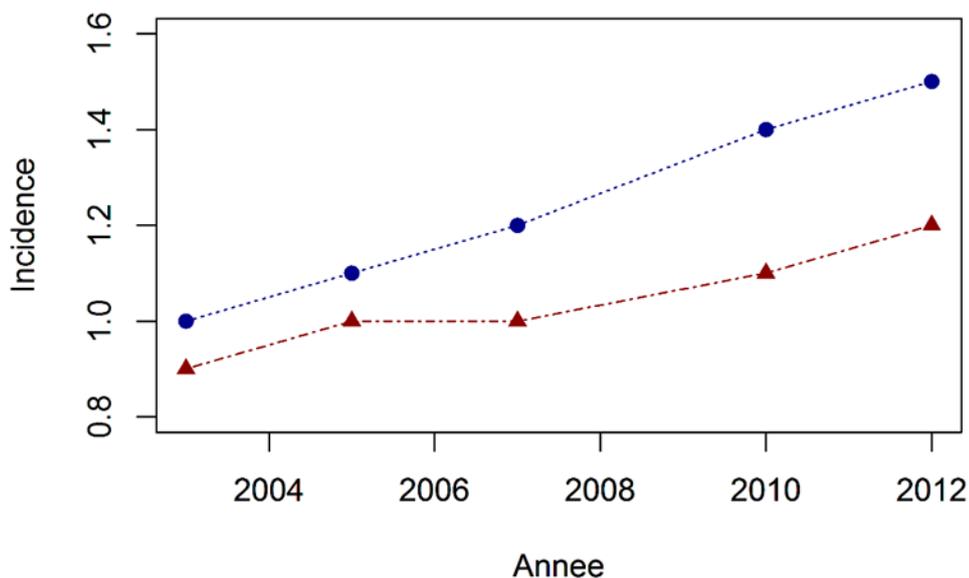


Figure 3 : Augmentation de l'incidence des lymphomes de la zone marginale en France de 2003 à 2012 chez l'homme (bleu) et chez la femme (rouge).

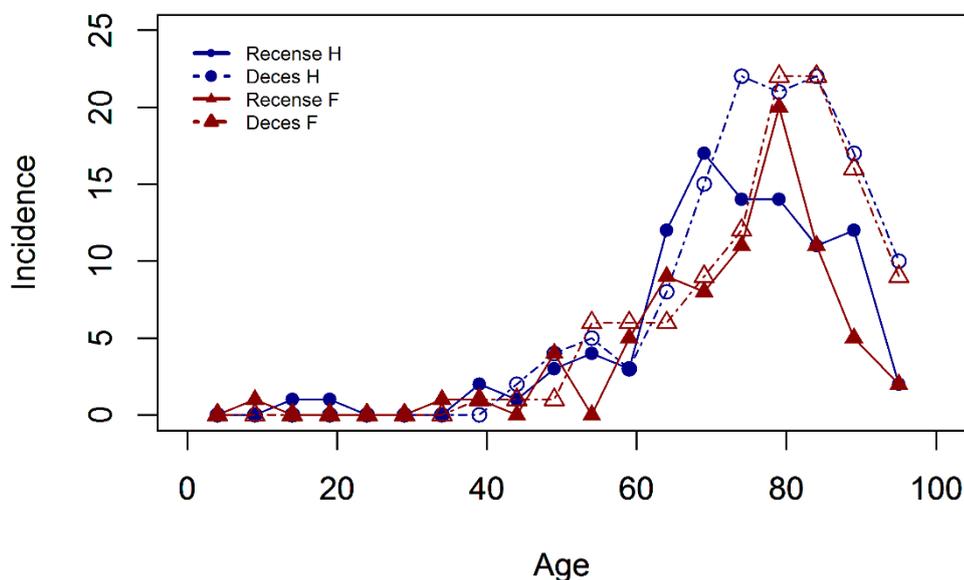


Les études publiées à partir des registres américains (SEER) (10), estiment la fréquence des différentes entités de lymphome de la zone marginale. Ainsi, 62% des lymphomes de la zone marginale correspondent à des lymphomes du MALT, 29.7% à des lymphomes de la zone marginale spléniques et 8% à des formes ganglionnaires. Les incidences respectives sont donc de 1,59/100.000, 0,83/100.000 et 0,25/100.000 (11,12).

2. Mortalité du lymphome de la zone marginale

Peu de registre font état des données de mortalité. Il semble cependant que la mortalité augmente parallèlement à l'incidence, sans que celle-ci ne permette de juger de l'imputabilité du lymphome, **Figure 4** (13). Des études rétrospectives suggèrent que les MALT ont un excellent pronostic avec une survie à 5 supérieures à 95%. La localisation (gastrique ou extra-gastrique) ou le stade (localisé ou disséminé) ne constitue pas un facteur pronostic (14-16). La survie sans progression est de l'ordre de 5 ans voire 8 ans pour les formes extra gastriques (15). La survie à 5 ans des formes splénique est de l'ordre de 50% (17–20) avec une survie sans progression de l'ordre de 4 ans. Enfin, la survie à 5 ans des formes ganglionnaires est de l'ordre de 50-70% (21,22). L'absence de plateau observé sur les courbes de survie suggère néanmoins qu'il s'agit de pathologie qui reste à ce jour incurable. La survie sans progression de ces formes est de l'ordre de 1 à 2 ans (22).

Figure 4 : Mortalité des lymphomes de la zone marginale en Ecosse (données de registre) chez l'homme (bleu) et chez la femme (rouge).



B. Anatomopathologie

Malgré leur appellation commune, les trois entités de lymphome de la zone marginale (le lymphome de la zone marginale ganglionnaire, splénique et des tissus lymphoïde associé aux muqueuses (MALT)) constituent des entités morphologiques distinctes.

1. Le lymphome du MALT

Le lymphome du MALT est une entité relativement indolente qui se développe dans un certain nombre de localisation extra ganglionnaire telle que l'estomac (70%), les annexes oculaires (12%), le poumon (14%), la thyroïde (4%) ou l'intestin grêle (1%). La localisation la plus fréquente est l'estomac où l'association avec l'infection à *Helicobacter pylori* est bien décrite (23). Une variante grêlique, aussi appelée maladie des chaînes

alpha est quant à elle associée à *Campylobacter jejuni* (24). Enfin, le rôle de *Chlamydia psittaci* est bien décrit dans les formes ophtalmiques (25). Les lymphomes du MALT en d'autres localisations sont quant à elles associées à l'inflammation chronique (maladie auto-immunes, satellite de tumeurs solides) ou infectieuses chroniques (14).

Les cellules expriment en général une immunoglobuline de surface (en général une IgM, plus rarement une IgA ou IgG) et des marqueurs B tels que le CD19, CD20, CD22, CD79a et CD79b mais n'expriment ni les CD5, CD10, CD23 et CCND1. L'expression du CD11c est faible et variable (1).

L'envahissement médullaire est considéré comme rare. Il est plus fréquent dans les formes palpébrales et pulmonaires que gastriques. Deux séries cependant retrouvent un infiltrat dans une proportion non négligeable de cas (près de 20% des cas (15) et 10% des formes non-gastriques (26)).

2. Le lymphome de la zone marginale splénique

Le lymphome de la zone marginale splénique est une entité beaucoup plus hétérogène. Le diagnostic est en général posé sur la présence de cellules circulantes, sur la pièce de splénectomie ou sur une biopsie ostéo-médullaire. Les lymphomes spléniques à lymphocytes villeux appartiennent à cette même entité. Il existe une association entre ces formes spléniques avec l'hépatite C (27). Il s'agit là aussi d'une entité indolente, souvent caractérisée par l'absence d'adénopathie. Les transformations sont occasionnelles (28).

Au plan phénotypique, les lymphomes de la zone marginale spléniques sont caractérisés par une expression forte de l'immunoglobuline de surface ainsi que par l'expression de marqueurs B tels que le CD19, CD20, CD22, CD79a et b. Le CD25 est

positif dans un tiers des cas tout comme le CD10. Le CD11c est positif dans 50% des cas. Le FMC7 est présent dans la plupart des cas. Le CD5 est habituellement négatif (29). Dans les formes positives, il existe souvent une discordance entre l'expression sanguine (CD5 négatif) et splénique (CD5 positif) (30). Le CD43, le CD103, l'annexine A1, BCL6, et la CCND1 sont constitutivement négatifs (1).

3. Le lymphome de la zone marginale ganglionnaire

Le lymphome de la zone marginale ganglionnaire constitue une nouvelle entité, regroupant le lymphome B à différenciation monocytoïde. Il s'agit d'une atteinte ganglionnaire primitive qui partage les caractéristiques des lymphomes de la zone marginale extra ganglionnaires ou spléniques sans argument en faveur d'une atteinte splénique ou extra-ganglionnaire. Les patients se présentent en général avec une atteinte ganglionnaire. Elle doit être différenciée d'une atteinte de contiguïté d'un MALT ou d'un LNH folliculaire. L'atteinte médullaire est rare. L'association à l'hépatite C a été décrite (31).

En cytométrie en flux les cellules expriment le CD19, le CD20, le CD22, le CD79a et b. L'expression du CD5 est rare tout comme celle du CD10 et du CD23. La CCND1 est négative. Le CD11c est parfois exprimé. Cinquante pourcent des cas sont CD45 positifs (32).

C. Génétique des lymphomes de la zone marginale

1. Cytogénétique conventionnelle

Dans les lymphomes du MALT, la trisomie 3 est retrouvée dans 20-75% des séries. Les trisomies 7, 12 et 18 sont moins fréquentes (33). Les MALT sont par ailleurs fréquemment associées à la t(11;18)(q21;q21) entre les gènes *BIRC3* (baculoviral IAP repeat containing 3) et *MALT1* (mucosae associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1). Un travail a rapporté la présence de cette translocation dans environ 27% des cas. Elle n'est cependant non retrouvée dans les lymphomes de la zone marginale ganglionnaires ou spléniques (34,35). Plus rarement on a décrit des t(1;14)(p22;q23), t(3;14) (p14.1;q32) et t(14;18) (q32;q21) (36–39). La fréquence et le type d'anomalie cytogénétique varient néanmoins en fonction du site tumoral (36).

Dans les lymphomes de la zone marginale splénique, 18% des patients ont une trisomie 3 identifiée par FISH (moins que dans le MALT). Les trisomies 7 et 12 ont été décrites. Des cas de t(11;14) ont été décrites mais les points de cassures diffèrent de ceux habituellement observés dans le lymphome du manteau ou le myélome (18) et semblent impliquer le gène *DDX6*. D'autres translocations, telle que la t(9;14)(p12;q32) ou t(9;14)(p13;q32) sont décrites. Les t(11;18) ne sont pas décrites. La perte du 7q31-32 est fréquente et la perte ou l'inactivation de *TP53* en 17q13 est présente dans 10% des cas (29).

Dans le lymphome de la zone marginale ganglionnaire de multiples anomalies ont été identifiées sans qu'aucune ne soit pathognomonique. Les gains de 1q, 2p, 2q, 6p, 6q sont les plus fréquents. Les pertes de 1q et 6q sont récurrentes. Les trisomies 3, 12, et 18 sont fréquentes contrairement aux monosomies. En termes de translocations, contrairement aux MALT et aux lymphomes spléniques, les translocations impliquant

BIRC3, *MALT1*, *BCL10* et *FOXP1* ne sont pas retrouvées. Les translocations impliquant l'*IGH* et *BCL6* ont été décrites (40). Les partenaires fréquemment décrits sont *DDX6* en 11q23 (41) et *GPR34* en Xp11.4 (42).

2. Réarrangement de l'*IGH*

Les analyses des mutations du V(D)J suggèrent que la cellule d'origine est une cellule du post-centre germinatif comme en témoigne le caractère hyper muté du V(D)J (43). Des cas d'évolution clonale par acquisition de mutation de l'*IGH* ont été décrites (43). Néanmoins, une fraction des patients ne présente pas de mutation somatique suggérant une potentielle origine pré centre germinatif chez certains d'entre eux (44).

3. Mutations

Les travaux de séquençage exomiques complets (45,46) ont identifiés les principaux gènes mutés dans les lymphomes de la zone marginale. Parmi ceux-ci, on retrouve les gènes impliqués dans la différenciation et l'homéostasie des cellules de la zone marginale normales. Les principales mutations identifiées concernent la voie de signalisation de NOTCH2 et NF- κ B.

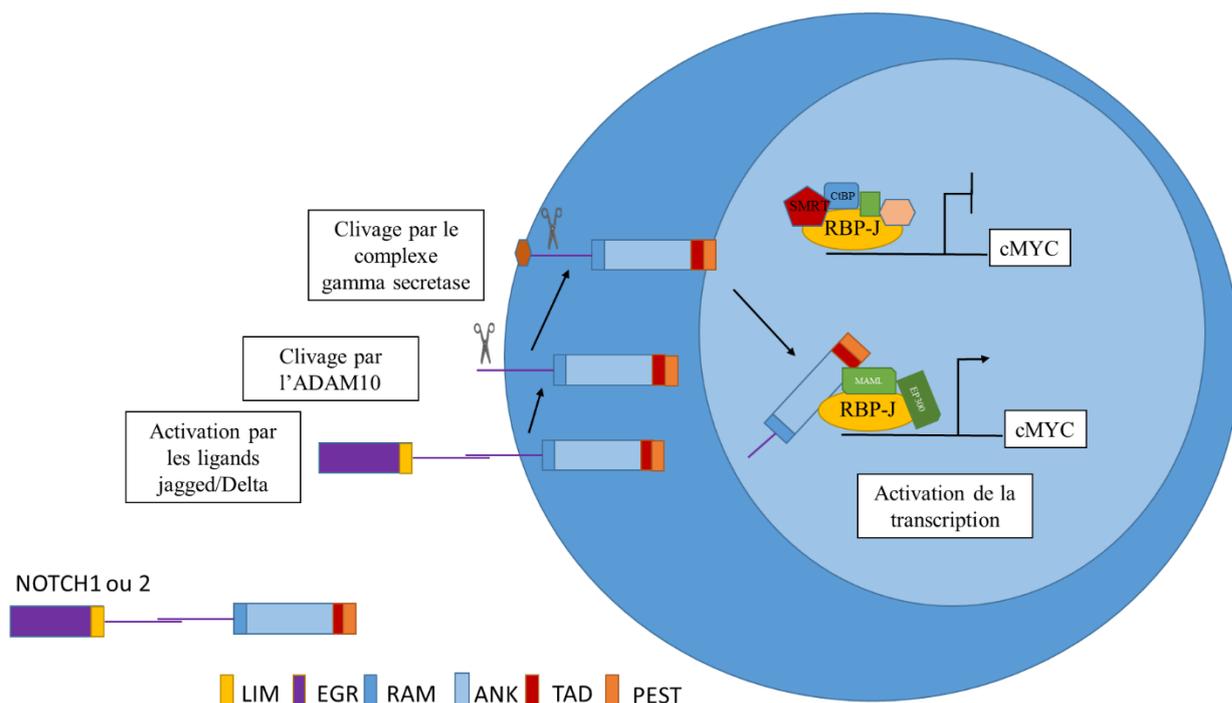
a) La voie de signalisation NOTCH2

L'engagement des cellules B matures et leur rétention dans le compartiment de la zone marginale requiert l'activation de la voie de signalisation NOTCH2. Les gènes de la famille NOTCH codent pour des récepteurs membranaires comprenant un domaine extracellulaire et une portion cytoplasmique comprenant plusieurs domaines : un domaine

RAM (RBP-Jkappa-associated module, qui lie RBJ), un domaine de signalisation nucléaire, une région de répétition d'ankyrine et un domaine PEST (impliqué dans la stabilité de la protéine). La stimulation de la partie extramembranaire de la protéine entraîne un clivage protéique membranaire par l'ADAM10 et un complexe gamma-sécrétase. Une fois clivée, NOTCH peut migrer vers le noyau, où elle déplace les corépresseurs de la transcription (tels que CtBP1 et SMRT) et recrute des co-activateurs de la transcription (tels que MAML et EP300) conduisant à l'activation de la transcription d'oncogène tel que *cMYC*, **Figure 5**. L'activation constitutive de cette voie, par des mutations est retrouvée dans près de 30-40% des lymphomes de la zone marginale. Dans 10-20% des cas il s'agit de mutations de *NOTCH2* auquel s'associe d'autres mutations telle que les mutations de *NOTCH1*, son paralogue, et *SPEN* un de ses principaux régulateur négatif (47).

L'altération de cette voie de signalisation semble être un élément précoce et conservée dans la genèse de ces hémopathies puisque ces altérations sont retrouvées dans l'entité récemment décrite de lymphocytose B-clonale de phénotype marginale (6,48) ainsi que dans les formes de lymphome diffus à grande cellules B associé à l'hépatite C supposé transformé (49).

Figure 5 : La voie de signalisation NOTCH. L'activation de NOTCH1 ou 2 par un signal extracellulaire conduit au clivage successif de la protéine par l'ADAM10 et un complexe de protéase. La partie intracellulaire peut alors migrer dans le noyau, déloger des corépresseurs, recruter des co-activateurs et activer la transcription (adapté de Lobry et al)(50).



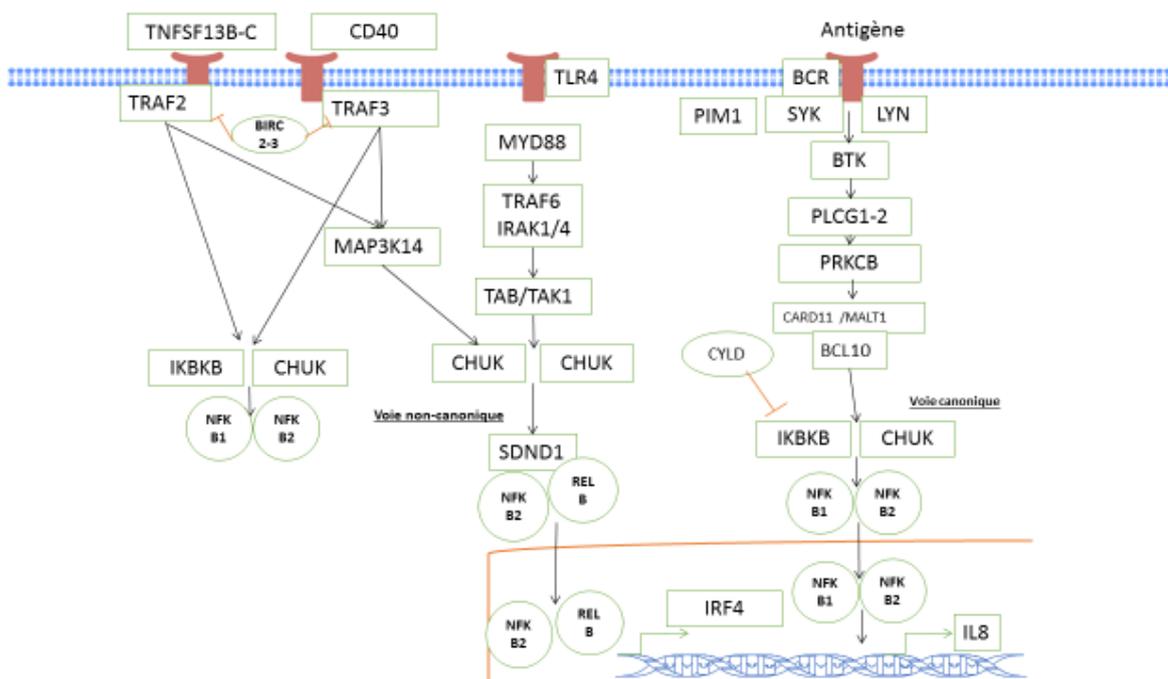
b) La voie de signalisation NF-κB

L'activation transitoire de la voie de signalisation NF-κB est centrale au développement des cellules lymphoïdes B matures. De manière physiologique, elle est impliquée dans la différenciation et la survie des cellules B normales. Son activation constitutive a été mise en évidence dans de nombreuses hémopathies lymphoïdes telles que le myélome et les lymphomes B-diffus à grandes cellules B, **Figure 6**.

Des données indirectes impliquent cette voie de signalisation dans les lymphomes de la zone marginale. On observe ainsi des activations de la voie NF- κ B dans les modèles murins de lymphome de la zone marginale (51,52). De plus des données d'expression (53), suggèrent une activation constitutive de la voie NF- κ B dans les lymphomes de la zone marginale splénique du moins.

Au plan mutationnel, la voie NF- κ B peut être activée de plusieurs manières (54). La voie non-canonique peut être activée par la voie des Toll-Like receptor (TLR). Ainsi, les mutations de *MYD88* L265P sont décrites dans 7 à 15% des formes spléniques. Elles ne sont pas systématiquement associées à une différenciation lymphoplasmocytaire ou une IgM de surface (47,55). Les mutations de *TRAF3* et l'inactivation de *BIRC3* ont également été décrites.

D'autres gènes impliqués dans la voie canonique sont également mutés dans les lymphomes de la zone marginale tels que *CD79B*, *CARD11*, *IKBKB* et *TNFAIP3* (7%) (46,47,56)

Figure 6 : Principaux gènes impliqués dans la voie de signalisation NF- κ B.

c) *KLF2*

KLF2 ou Kruppel-like factor 2 est impliqué dans la lymphogénèse B. Son altération est responsable d'hyperplasie splénique de la zone marginale chez la souris (57,58). Des mutations ont été décrites dans les lymphomes de la zone marginale spléniques et plus rarement dans d'autres formes. La majorité des mutations sont des petites insertions/délétions ou des décalages du cadre de lecture. Les mutations non-sens sont regroupées dans les régions C-terminales. D'un point de vue fonctionnel, ces mutations sont inactivatrices et empêchent *KLF2* de réprimer de la voie NF- κ B. Ces mutations s'associent préférentiellement aux réarrangements *IGHV1-2* et à la *del(7q)*. Elles sont négativement corrélées à la présence de mutations de *MYD88*. Les mutations de *NOTCH2*, *TRAF3*, *TNFAIP3* et *CARD11* étaient observées dans les deux groupes (59). La fréquence des mutations de *KLF2* varie selon les séries de 12 à 42% (47,59).

d) Autres

D'autres mutations sont retrouvées dans les lymphomes de la zone marginale. *TP53* est muté dans 16% des cas. (47). Les associations entre *del(17p)* et mutations ne sont pas systématiques (60). Des mutations faisant intervenir les régulateurs du cytosquelette sont également décrites (46). Leur interprétation et leur caractère pathogène sont difficile à prédire.

L'ensemble de ces données sont résumées dans le **tableau 1**

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques des lymphomes de la zone marginale

| | MALT | Splénique | Ganglionnaire |
|------------------------------|--|---|---|
| Fréquence | 62% - 70% gastrique - 14% poumon - 12% oculaire | 30% - Villeux - Non-villeux | 8% - Monocytoïde - Non-monocytoïde |
| Facteurs étiologiques | H.pylori C.jejuni C.psitacci | Hépatite C | Hépatite C |
| Cytogénétique | Trisomie 3 (20-75%) t(11;18)(q21;q21) t(1;14)(t1;14)t(14;18) | Trisomie 3 (18%) Del(7q) Rare: t(11;14) | Gain 6p,6q,1p,1q,2p,2q t(11;14)(q23;q23) |
| Mutation | <i>NOTCH2, KLF2, MYD88, TNFAIP3, CD79B, BIRC3</i> | <i>NOTCH2, KLF2, CD79A/B, BIRC3, CARD11, TRAF3, TNFAIP3, IKKB</i> | <i>NOTCH2, KLF2, CD79A/B, BIRC3, CARD11, TRAF3, TNFAIP3, IKKB</i> |
| Pronostic | 95% à 5 ans | 50% à 5 ans | 50-70% à 5 ans |

II. La transformation de lymphome de la zone marginale

A. Incidence

L'incidence des transformations de haut grade est difficile à estimer. Dans une série publiée par Meyer (61) après un suivi de 13 mois, 11% des patients suivis pour un lymphome de la zone marginale ont transformé soit une fréquence annuelle de 2.4%. Parmi ceux-ci, une majorité de MALT (60%), suivis par les formes ganglionnaires (26%) et par les formes spléniques (13%). Parmi les facteurs de risques de transformation, on note le taux de LDH au diagnostic et les antécédents de néoplasies. Les incidences retrouvées dans les autres séries sont superposables (16,62)

Le diagnostic est avant tout clinique et se caractérise par l'apparition de signe B, une altération de l'état général et une progression du syndrome tumoral. Elle peut parfois être inaugurale et précéder le diagnostic de lymphome indolent (15,62).

B. Anomalies Morphologiques

La majorité des patients transforment dans une forme non-centre germinatif (GC) de lymphome diffus à grandes cellules B. Elles sont caractérisées le plus souvent par la présence de foyers de grandes cellules au sein de la tumeur. Dans les MALT, l'infiltrat est plus diffus que dans les formes primitives de haut grade de localisation digestive (15,63,64).

Exceptionnellement, il est décrit des formes composites associant lymphome de la zone marginale et maladie de Hodgkin (65,66).

C. Anomalies Génétiques

La parenté entre les formes indolentes et transformés est établie au plan génétique depuis de nombreuses années (67). La parenté entre les lymphomes de la zone marginale et la maladie de Hodgkin n'a cependant jamais pu être étudiée.

Les lymphomes diffus à grandes cellules B de type non-GC, comme les lymphomes de la zone marginale sont caractérisés le plus souvent par une activation constitutive de la voie de signalisation NF- κ B (54,68). Cette dernière fait intervenir un certain nombre de mutations dans les lymphomes diffus à grandes cellules telles que:

- *CARD11*, muté dans 10% des cas. Ces mutations entraînent une activation de NF- κ B et la phosphorylation de BCL10.

- *CD79A* et *CD79B* muté dans approximativement 10-20% des cas. Des mutations activatrices sur un résidu tyrosine dans le premier domaine ITAM entraînent une activation constitutive du BCR et donc des voies NF- κ B, PI3K et MAP-kinase (69).

- *MYD88* est muté dans 30% des cas dans le domaine TOLL-like. MYD88 coordonne l'assemblage du complexe NF- κ B après activation des TLR (70–72). Les mutations L265P promeuvent la survie cellulaire par l'activation de NF- κ B. Les autres mutations sont beaucoup plus rares.

- *TNFAIP3* est muté dans 5% des cas. Ce gène qui code pour une protéine, A20, qui est hautement régulée par le TNF. Il s'agit d'une protéine en doigt de zinc qui inhibe NF- κ B et l'apoptose induite par le TNF. Les mutations sont inactivatrices (73)

L'altération de ces gènes n'a jamais été mise en évidence directement dans les formes transformées. D'autres gènes cependant ont été impliqués directement dans la transformation. Depuis les années 1990, les anomalies de *TP53* ont été décrites dans les

formes de bas grade et les formes transformées. Les pertes d'hétérozygoties sont plus fréquentes dans les formes de haut grade (7% versus 28.6%) tout comme les mutations (19% versus 33.3%) (60). En terme d'expression la perte de *CXCR4* est par ailleurs associée à la progression (74).

D. Anomalies épigénétiques

Les études de CHIP-seq ont permis d'analyser les profils de méthylation des patients atteints de lymphome de la zone marginale, principalement splénique. Des profils hyperméthylés, associés à une mortalité plus élevée, sont corrélés à l'utilisation d'un IGHV1-02, aux mutations de *NOTCH2*, et à la del(7q31-32). Elles seraient par ailleurs associées à un risque accru de transformation. L'exposition aux agents hypométhylants entraîne une réversion du phénotype (75)

III. Objectif

L'objectif de ce travail est de décrire les mutations présentes dans un panel de gènes (*MYD88*, *CD79A*, *CD79B*) impliqués dans la voie NF-κB et présents aussi bien dans les lymphomes de la zone marginale que les lymphomes diffus à grandes cellules B de type non-GC. Ensuite nous nous sommes intéressés à *KLF2*, fréquemment muté dans les lymphomes de la zone marginale en vue d'évaluer son association à la transformation et la rechute. Enfin, nous nous sommes intéressés aux mutations de *CXCR4*, dont l'expression est associée aux transformations et aux localisations extra ganglionnaires.

Ces mutations ont été recherchées dans une série de lymphome de la zone marginale, de tout sous-type (n=46) et leur évolution mesurée chez une fraction de ces patients sur des prélèvements séquentiels soit non-transformés (n=14), soit transformés (n=4).

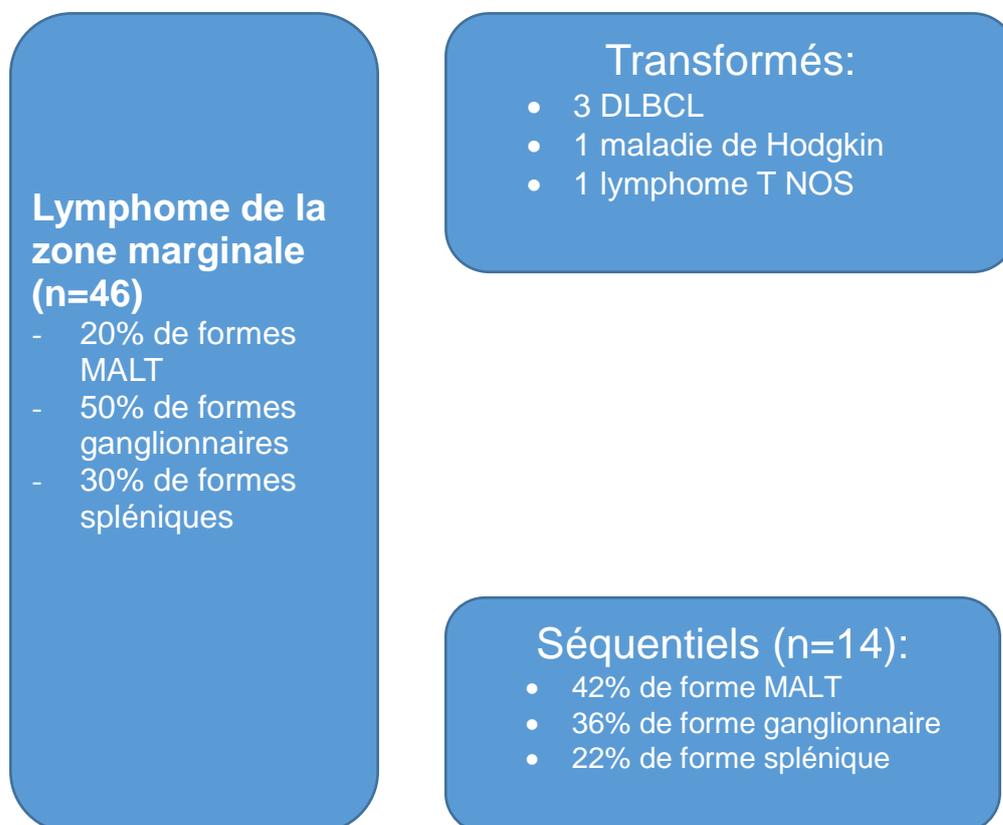
En vue de compléter ce travail, nous nous sommes focalisés sur 3 patients pour lesquels nous possédions du matériel au moment de la phase indolente et à la transformation en lymphome B-diffus à grande cellule et réalisé, par séquençage de nouvelle génération, l'analyse d'un panel de dix-neuf gènes.

MATERIELS ET METHODES

I. Phase préanalytique

Des échantillons de lymphome de la zone marginale ont été identifiés dans la région Nord à partir de patients ayant un ou plusieurs prélèvements d'anatomopathologie. L'accent a été mis sur les patients ayant plusieurs échantillons (prélèvements séquentiels) ou chez qui on retrouvait une notion de transformation.

Figure 7 : Population



Les ADN ont été extraits à partir de coupes paraffinées. Après un déparaffinage au xylène de 45 minutes et un temps de séchage de l'alcool prolongé (20-25 minutes), les échantillons ont été extraits grâce au Kit Qiagen-FFPE-extraction® en respectant les consignes du fabricant. Les ADN ainsi obtenus ont été dosés soit par nano-drop soit par picogreen Quant-IT®, Invitrogen. Un échec d'extraction a été ainsi obtenu, cinq n'étaient pas amplifiables.

II. Séquençage Sanger

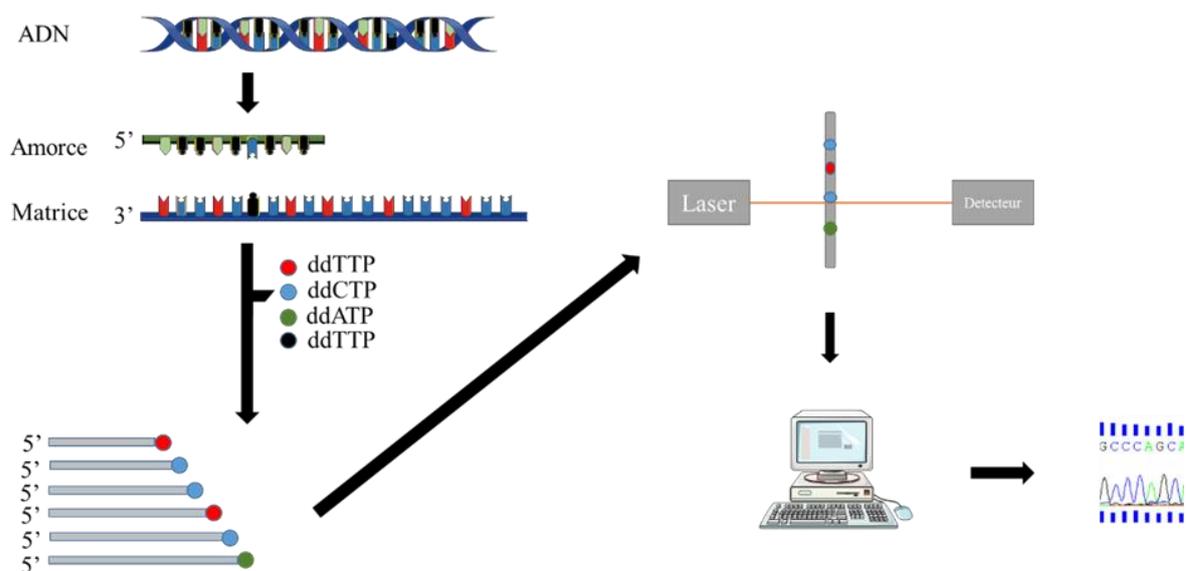
A. Principe

Le séquençage traditionnel mis au point par Sanger est une méthode de séquençage basée sur l'incorporation d'un acide dideoxynucleotidique par une ADN-polymérase au cours d'une réaction de réplication entraînant la terminaison de la chaîne. L'analyse de la taille des différents fragments répliqués et de leur fluorescence permet la déduction de la séquence.

Il s'agit d'une méthode par synthèse enzymatique qui consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (encore appelé amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléase en présence d'un mélange des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et d'une faible concentration de quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) chacun associé à un marqueur fluorescent différent. Une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ces didésoxynucléotides empêchent la poursuite de l'élongation. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent à toutes les

positions dans la séquence. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire sur un gel de polyacrylamide. Après excitation laser, il est possible de déchiffrer la suite de chacune des bases de la séquence. Une dernière étape de traitement bio-informatique permet enfin la reconstruction d'une séquence entière à partir de tous les fragments séquencés, **Figure 8**.

Figure 8 : Principe du Séquençage Sanger. Après une réaction de PCR permettant d'amplifier la quantité d'ADN à séquencer, le produit de PCR purifié, est soumis à une réaction d'extension où en présence de faible quantité de didésoxynucléotides marqués une polymérisation de l'ADN est réalisée. Les produits d'extensions, de longueurs différentes, ainsi obtenus sont séparés par gel et soumis à une excitation laser. Le signal détecté est alors traité informatiquement permettant la déduction de la séquence.



B. Régions d'intérêt pour *CD79A/B* et *CXCR4*

Compte-tenu de la répartition des mutations de *CD79A* et *CD79B* seul le premier domaine ITAM, a été séquencé par technique Sanger. Pour *CXCR4*, le design de la PCR se focalise sur la région codant pour la partie C-terminale de la protéine. Les amorces et les conditions de PCR, déjà au point au Centre de Biologie Pathologie de Lille, sont résumées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2: Résumé des conditions de PCR de *CD79A*, *CD79B* et *CXCR4*.

| | Amorces | Taq de PCR | Condition de thermocyclage |
|---------------------------------|--|------------|--|
| <i>CD79A</i> (585pb) | 5'agggtgctgatgttcgct3' 3'gaagacccccgaaggaat5' | GC rich | T1 : 95°C 5 min T2 : 95°C 60 sec T3 : 58°C 60 sec (40 cycles) T4 : 72°C 1 min T5 : 72°C 10 min |
| <i>CD79B</i> (286pb) | 5'gggctgggggacactaacactc3' 3'tgggtgctcacctacagaccac5' | GC rich | T1 : 95°C 10 min T2 : 95°C 30 sec T3 : 62°C 30 sec (40 cycles) T4 : 72°C 2 min T5 : 72°C 10 min |
| <i>CXCR4</i> (351pb) | 5'gctgccttactacattgggatcagc3' 3'acagatccgtccctggacaccggtt5' | HotStar | T0 : 95°C 15 min T1 : 95°C 60 sec T2 : 60°C 60 sec (35 cycles) T3 : 72°C 60 sec T4 : 72°C 10 min |

C. Mise au point de *KLF2*

Pour la mise au point de *KLF2* une première série d'amorces ont été dessinées (F. Leprêtre et E Boyle). En vue de limiter le nombre de PCR et l'homologie de séquence, des fragments de 300-400pb ont été utilisés, **Tableau 3**.

Tableau 3: Première série d'amorces de *KLF2*

| Nom | Amorce | Taille |
|-------------|----------------------|--------|
| Exon1_clipf | GCCACTCACCGGTGTCC | 196 |
| Exon1_clipr | GCAGCCCACGTTCTACTACC | |
| Exon2_1f | GGTGGTAAAAGGCAAGCAGC | 368 |
| Exon2_1r | CCTGGTCAAGGCCGAGC | |
| Exon2_2f | GCACGGCCGCTTTCTGC | 355 |
| Exon2_2r | CTCTTCGACGACGCGGCC | |
| Exon2_3f | CCTGCATTACGCGCCGC | 330 |
| Exon2_3r | CGGGAGGAGAGGTCGGATTC | |
| Exon3.1f | CATACGTGCCCTGTCCTG | 365 |
| Exon3.1r | GCGTGGCTACAGAGGGTC | |

Ces amorces ont permis de séquencer l'ADN de BCWM1 et MCWM1, deux lignées cellulaires tests. Néanmoins, compte tenu des nombreux échecs de PCR sur ADN issus de prélèvements fixés et paraffinés, souvent dégradés, des fragments plus petits ont été pris en se basant sur les PCR définies par Alexandra Clipson (59), **Tableau 4, Figure 9**. Les PCR 2.4 et 2.5 sont restées non-amplifiables sur les échantillons fixés malgré de nombreux essais de polymérase (HotStart®, FastStart®, GC-melt®, « Magic enhancer » Quiagen®), ou de condition de PCR (gradient de température de 55-64 degré et gradient de magnésium, adjonction d'adjuvant tel que le sérum d'albumine bovine)

Figure 9: Répartition des PCR de *KLF2* : en rouge la première série d'amorce en vert les amorces de Clipson (59).

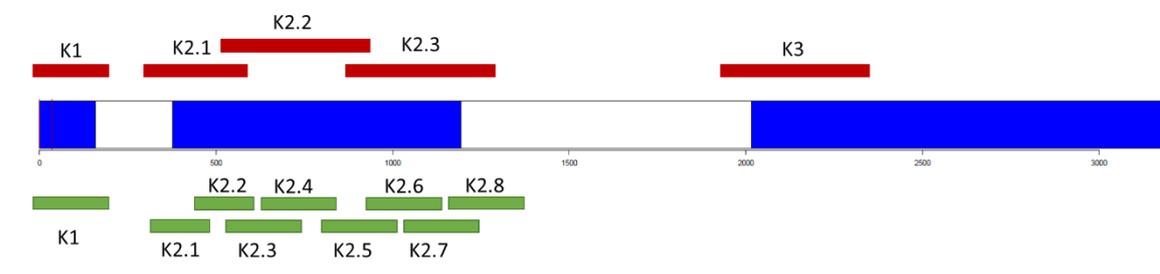


Tableau 4: Deuxième série d'amorces de *KLF2*

| Nom | Amorce | Taille |
|-------------|----------------------|--------|
| KLF2_Ex1_1f | GCCACTCACCGGTGTCC | 196 |
| KLF2_Ex1_1r | GCAGCCCAYGTTCTACTACC | |
| KLF2_Ex2_1f | TAGGGTGGTAAAAGGCAAGC | 160 |
| KLF2_Ex2_1r | ATCCAGCCCCATGGACA | |
| KLF2_Ex2_2f | CACCGACGACGACCTCA | 182 |
| KLF2_Ex2_2r | GCAGCAGCTCAGACACCAG | |
| KLF2_Ex2_3f | GCGTTCTATTACCCCGAACC | 160 |
| KLF2_Ex2_3r | GCTCGGCCTTGACCAG | |
| KLF2_Ex2_4f | CGACCCGAGCTGGATG | 198 |
| KLF2_Ex2_4r | ACCTCGCATGCACGAAG | |
| KLF2_Ex2_5f | GCCGAGCCCCCTGAAG | 225 |
| KLF2_Ex2_5r | GAAAGGCGGCGGGAAG | |
| KLF2_Ex2_6f | ACACACCGCCGCTCAG | 222 |
| KLF2_Ex2_6r | GCGGCGTGAGGAGACC | |
| KLF2_Ex2_7f | CCCAGCCTTCGGTCTC | 182 |
| KLF2_Ex2_7r | CGTAGCTGCAGGTGTGAGTG | |
| KLF2_Ex2_8f | CTGGAGGCCAAGCCAAAG | 202 |
| KLF2_Ex2_8r | GCTGGGAATCCGACCTCT | |

D. PCR quantitative et mise en évidence de la L265P de *MYD88*

La recherche de mutation L265P de *MYD88* a été réalisée par PRC quantitative en utilisant le kit qBiomarker® de Qiagen selon les recommandations du manufacturier. Un réplica a été réalisé pour chaque échantillon. Le témoin positif était la lignée cellulaire BCWM1 et ReL le témoin négatif.

Il s'agit d'une PCR quantitative qui se base sur deux principes : l'activité exonucléasique de la TaqPolymérase et le FRET (Fluorescence résonance energy transfert). Une amorce spécifique de l'allèle muté ainsi que d'un allèle de référence ont été utilisées. Lorsque la sonde est intacte, qu'elle s'hybride et que l'amplification a lieu, elle émet une fluorescence. Le Ct ou cycle threshold correspond à l'intersection entre la ligne de base et les courbes de fluorescence. Une fois normalisées, ces valeurs sont comparées à celle de l'allèle rapporteur (Calcul du $\Delta Ct = \Delta Ct^{MYD} - \Delta Ct^{REF}$). Si elle est supérieure au témoin positif, alors la mutation est absente. En réalisant une gamme de dilution du témoin positif, une idée de la fraction allélique peut être obtenue.

III. Séquençage de nouvelle génération

Les ingénieurs du Centre de Biologie Pathologie (S Geffroy et A Caillaud) ont réalisé le séquençage d'un panel de gènes impliqués dans les hémopathies lymphoïdes des échantillons pour lesquels nous disposons à la fois de la forme tumorale indolente et de la forme transformée en lymphome diffus grandes cellules B

Le Séquençage nouvelle génération ou NGS, est une technique plus rapide et moins coûteuse en matériel que le séquençage Sanger. La méthode AmpliSeq® est une approche qui combine une PCR d'amplification et une réaction de séquence en une seule

étape. L'analyse se par un seul capillaire par une méthode de semi conduction ionique (Ion torrent®, Life technology) qui se base sur la détection d'ion hydrogène libéré au cours de la réaction de polymérisation. Le plan de séquence IAD44330_92_Design a été utilisé comprenant deux pools. Le pool 1 regroupant 176 amplicons et le pool 2 recouvrant 171 amplicons. Deux librairies consécutives ont été réalisées : la première sur de l'ADN natif, la seconde sur de l'ADN obtenu après répllication le matériel par RepliG (DNA-FFPE-RepliG Kit ®, Quiagen). Les gènes analysés sont résumés ci-dessous, **Tableau 5**.

Tableau 5: Genès couverts par le plan de séquence Ampliseq®**IAD44330_92_Design**

| Gene | Référence | Locus | Localisation |
|-----------------------|------------------|--------------|-------------------------------|
| <i>ATM</i> | NM_000051 | 11q22,3 | chr11:108,175,402-108,186,638 |
| <i>BIRC3</i> | NM_182962 | 11q22,2 | chr11:102,188,181-102,210,135 |
| <i>BRAF</i> | <u>NM_004333</u> | 7q34 | chr7:140,433,813-140,624,564 |
| <i>CARD11</i> | NM_032415 | 7p21,1 | chr7:2,945,710-3,083,509 |
| <i>CD79A</i> | NM_001783 | 19q13,2 | chr19:42,381,190-42,385,439 |
| <i>CD79B</i> | _NM_000626 | 17q23,3 | chr17:62,006,098-62,009,704 |
| <i>DNMT3A</i> | NM_022552 | 2p13,2 | chr2:25,455,830-25,565,459 |
| <i>EZH2</i> | NM_004456 | 7q36,1 | chr7:148,504,464-148,544,397 |
| <i>FBXW7</i> | NM_033632 | 4q31,3 | chr4:153,332,455-153,456,393 |
| <i>KMT2D</i> | NM_003482 | 12q13,12 | chr12:49,412,758-49,449,107 |
| <i>KRAS</i> | NM_033360 | 12p12,1 | chr12:25,386,768-25,403,863 |
| <i>MYD88</i> | 612260 :omim | 3p22,2 | chr3:38,179,969-38,184,512 |
| <i>NOTCH1</i> | NM_017617 | 9q34,3 | chr9:139,396,889-139,408,003 |
| <i>NOTCH2</i> | NM_024408 | 1p12 | chr1:120,492,743-120,594,328 |
| <i>NRAS</i> | NM_002524 | 1p13,2 | chr1:115,247,085-115,259,515 |
| <i>PTEN</i> | NM_000314 | 10q23,31 | chr10:89,623,195-89,728,532 |
| <i>SF3B1</i> | NM_012433 | 2q33,1 | chr2:198,281,465-198,299,771 |
| <i>TNFAIP3</i> | NM_006290 | 6q23,3 | chr6:138,188,325-138,204,451 |
| <i>TP53</i> | NM_001126112 | 17p13,1 | chr17:7,571,720-7,590,868 |

RESULTATS

I. Données démographiques

L'âge médian au diagnostic dans notre cohorte est de 57 ans (range : 22 à 74 ans). Huit patients parmi les quarante-six ont présenté une transformation prouvée histologiquement. Pour six d'entre eux, il s'agit d'un lymphome diffus à grandes cellules B. Une patiente a une forme composite associant un lymphome de la zone marginale et une maladie de Hodgkin. Le dernier a un lymphome de phénotype T, NOS selon la classification OMS. Trois de ces patients (38%) se sont vu découvrir une forme transformée avant même ou au diagnostic de la forme indolente. Parmi les patients transformés, 50% présentaient une forme ganglionnaire, 25% une forme splénique et 25% un MALT. A noter, tous les MALT transformés étaient de localisation gastrique et étaient H. pylori négatif dans notre cohorte. Tous les patients ont justifié d'un traitement à base de chimiothérapie en association à une immunothérapie. Deux patients sont décédés de maladie progressive. Soixante-deux pourcent sont en rémission complète après un suivi médian de 52 mois.

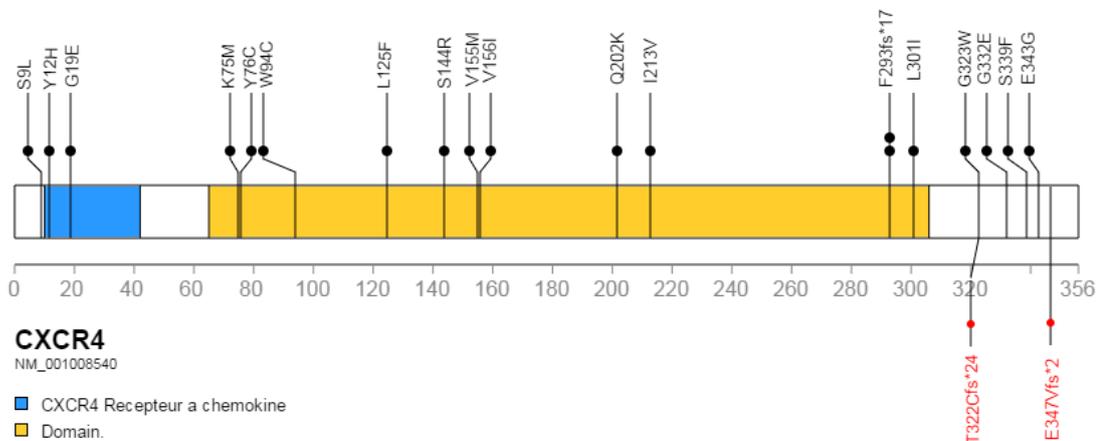
II. Répartition des mutations dans les lymphomes de la zone marginale

Aucune mutation de *CD79A* et *CD79B* n'a été mise en évidence dans notre cohorte de lymphomes de la zone marginale non transformés.

Deux mutations de *CXCR4* ont été mises en évidence. Toutes deux sont situées dans la partie C-terminale du gène. La première est une c.1039_1040delAG entraînant un décalage du cadre de lecture et la formation d'une protéine tronquée (p.E347Vfs*2). Cette dernière était conservée dans les différents sites et prélèvement séquentiels évalués (moelle, sang, ganglion). La deuxième était une délétion de cinq paires de bases (c.964_968delACCTC) entraînant un décalage du cadre de lecture et un arrêt prématuré de la séquence (p.T322Cfs*24). Toutes deux ont été mises en évidence dans des formes spléniques circulantes, **Figure 10**.

Figure 10: répartitions des mutations de CXCR4. Panneau A : Ensemble des mutations décrites dans la base COSMIC (au-dessus de la ligne de base). Nos mutations sont en rouge au-dessous de la ligne de base. Panneau B : Mutation c.1039_1040delAG et mutation c.964_968delACCTC.

A]



B]

| CXCR4 | Séquence |
|-------------------|--|
| c.964_968delACCTC | TGCCCAGCAGCAGCACTCACCTCTGTGAGCAGAGGGTCCAGCCTCAAGATCCTCTCCAAAGGAAAGCGA S A Q H A L T S V S R G S S L K I L S K G K F |
| Sens | |
| Anti-sens | TGCCCAGCaCGCaCTCACCCTCTGTGAGCAGAGGGTCCAGCCTCAAGATCCTCTCCAAAGGAAAGCGA |
| c.1039_1040delAG | GATCCTCTCCAAAGGAAAGCGAGGTGGACATTCATCTGTTCCACTGAGTCTGAGTCTTCAAGTTTTC K I L S K G K R G G H S S V S T E S E S S S F |
| Sens | GATCCTCTCCAAAGGAAAGCGAGGTGGACATTCATCTGTTCCACTGAGTCTGAGTCTTCAAGTTTTC gATCCTCTCCAAAGGAAAGCGAGGTGGACATTCATCTGTTCCACTGAGTCTGAGTCTTCAAGTTTTC |
| Anti-sens | gAtCCTCTCCAAAgGAAAgcGAGGtGGaCaTtCaTcTGTtTcCaCtgGAGTCTGAGTCTTCAAGTTTTC |

Nous avons mis en évidence des mutations de *MYD88* chez trois patients. Le premier patient était porteur d'un lymphome de la zone marginale ganglionnaire, non transformé sans pic IgM. Le second patient, un lymphome du MALT gastrique. La mutation de *MYD88* a été mise en évidence sur deux prélèvements successifs. L'électrophorèse des protéines sériques n'a pas été réalisée chez ce patient. Enfin, le troisième patient, présentant une mutation de *MYD88*, était porteur d'un lymphome de la zone marginale splénique. Il n'avait pas de pic monoclonal IgM. Aucun de ces patients ne présentait de différenciation plasmocytaire à la biopsie. Deux patients supplémentaires avaient un prélèvement ambigu, qui nécessite confirmation.

Le séquençage de *KLF2*, n'a pu être réalisé de manière exhaustive que dans la partie 3' du gène correspondant aux PCR *KLF2*-2.7, *KLF2*-2.8 et *KLF2*-3). Une mutation c.860c>g (p.S287W) a été mise en évidence chez un patient porteur d'une forme splénique. Cette mutation a déjà été décrite dans la base de données COSMIC (76) avec un score de Grantham à 177 (77). Une seconde mutation, c.982g>t (p.G328C), en amont du doigt de zinc, a été mise en évidence dans une localisation musculaire de lymphome de la zone marginale. Cette dernière n'est pas décrite dans la base COSMIC (76). Son score de Grantham théorique est de 159 suggérant son caractère potentiellement pathogène (77). Par ailleurs nous avons identifié une mutation (c.98g>t) dans la région 5'UTR d'un patient atteint d'un zone marginale ganglionnaire. Bien que décrit comme polymorphisme, son caractère pathogène n'est néanmoins pas exclu puisqu'il s'agit d'un site d'épissage, **Figure 11**.

Figure 11: Répartition des mutations de *KLF2*. Panneau A : Dans la base de données COSMIC la plus part des mutations sont situées dans la région Cterm de la protéine (au-dessus de la ligne de base). Nos mutations (en rouge au-dessous de la ligne de base) sont situées dans le Hotspot. Panneau B : Exemple de mutation de *KLF2* mise en évidence par séquençage Sanger

A]



B]

| | <i>KLF2</i> | cgcgccactaccgaaagcacacg ggcacggccattccagtgccatctgtgcatcgtgcc |
|---------------------------------|-------------|---|
| | | T R H Y R K H T G H R P F Q C H L C D R A |
| Patient 4: Composite (ganglion) | Anti-sens | CGCGCCACTACCGAAAGCACACGGGCCACCGGCCATTCCAGTGCCATCTGTGCGATCGTGCC' |
| | Sens | CGCGCCACTACCGAAAGCACACGGGCCACCGGCCATTCCAGTGCCATCTGTGCGATCGTGCC' |
| Patient 4: Indolent (muscle) | Anti-sens | CGCGCCACTACCGAAAGCACACGGGCCACCGGCCATTCCAGTGCCATCTGTGCGATCGTGCC' |
| | Sens | CGCGCCACTACCGAAAGCACACGGGCCACCGGCCATTCCAGTGCCATCTGTgCGATCGTGCC' |

III. Répartition des mutations dans les formes transformées

A. Sanger

En vue de préciser les caractéristiques des formes indolentes et transformées, ces mutations ont été recherchées dans les quatre formes transformées dont nous disposons.

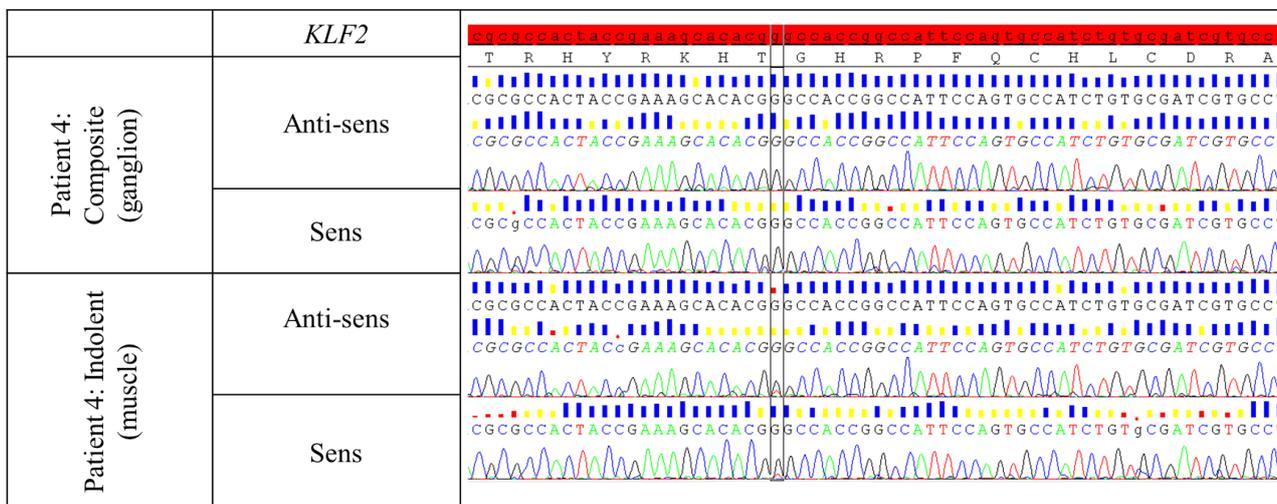
Le **patient 1**, qui présente une leucémie à lymphocyte villeux, est porteur d'une mutation de *CXCR4* et la conserve dans les quatre prélèvements successifs du diagnostic à la transformation.

Le **patient 2**, présente un lymphome splénique circulant transformé au diagnostic. Dans le prélèvement transformé une mutation c580dupC de *CD79B* responsable d'un décalage du cadre de lecture, p.H194PfsX9, est mise en évidence **Figure 12**. Cette dernière n'était pas présente dans la forme indolente.

Le **patient 3**, avait une mutation de *MYD88* L265P dans ses deux prélèvements indolents. Il a conservé cette mutation lors de sa transformation.

Le **patient 4**, porteur d'une forme particulière de lymphome composite (maladie de hodgkin et lymphome de la zone marginale) présente une mutation de l'exon 3 de *KLF2* au niveau musculaire (indolent) mais cette dernière n'est pas observée dans la forme transformée, malgré un infiltrat non-négligeable (30% du prélèvement ganglionnaire).

Figure 12: Mise en évidence de la mutation c580dupC entrainant un décalage du cadre de lecture de *CD79B* et la formation d'une protéine tronquée



B. Séquençage de nouvelle génération

Une analyse approfondie de trois patients pour lesquels nous disposons de prélèvements tumoraux indolents et transformés (**patient 1, 2 et 3**) a été réalisée. Un panel de gènes dit lymphoïde a été recherché par séquençage de nouvelle génération (Ampliseq®). La couverture médiane par amplicon était de 1867 (950-2250).

Pour le **patient 1**, cela a permis de mettre en évidence une mutation de *TP53* dans la forme indolente et transformée. La fréquence allélique du SNP rs1042522 (*TP53* c.215C>G) estimé à 83% dans la phase indolente et 72% dans la forme transformé nous orienterait vers une atteinte bi allélique suggérant la perte d'hétérozygotie associée. Ce patient avait par ailleurs une mutation de *CXCR4* présente sur l'ensemble des prélèvements.

Le **patient 2** a une mutation de faux sens de *BIRC3* dans la forme indolente et transformée (c.1585C>T, conduisant à une mutation p.Q528*). Cette mutation s'associe à une perte de fonction. Elle est située dans le hotspot communément décrit, **Figure 13**. Comme observé en Sanger, cette patiente acquiert une mutation de *CD79B* (c.580dupC).

Il est néanmoins difficile de déterminer si ces deux anomalies sont dans le même clone. En effet, la fraction allélique est à interpréter avec prudence dans cette étude compte tenu de la pureté de l'échantillon. Néanmoins, si on normalise nos échantillons à un des un des polymorphisme nucléotidique bien validé observé chez cette patiente (rs1042522 de *TP53*)(78) la fréquence allélique de l'allèle muté de *BIRC3* passerait de 21% dans la forme indolente à 11% dans la forme transformé suggérant, sous réserve de l'absence d'apparition d'une del(11q) dans la forme transformée, que *BIRC3* et *CD79B* ne sont pas mutés dans le même clone, **Figure 14**.

Outre la mutation de *MYD88*, le **patient 3** semble avoir une mutation de *MLL2* avec la même fréquence allélique que *MYD88*. Compte tenu des difficultés de séquençage de ce gène, une vérification est néanmoins requise.

L'ensemble des données relatives à ces patients sont résumés dans le **Tableau 6-7**.

Tableau 6: Résumé des variants potentiellement pathogènes présents dans les couples indolents et transformés

| | Status | Gene | Mutation | Protéine | Fréquence |
|------------------|----------------|------------------------------|-----------------------|--------------------|------------|
| Patient 1 | Indolent | <i>TP53</i> | c.278delT | L93RfsX30 | 70% |
| | Transformation | <i>TP53</i> | c.278delT | L93RfsX30 | 47% |
| Patient 2 | Indolent | <i>BIRC3</i> <i>CD79B</i> | c1585C>T - | Q529X - | 21% - |
| | Transformation | <i>BIRC3</i> <i>CD79B</i> | c1585C>T c.580dupC | Q529X H194PfsX9 | 3% 29% |
| Patient 3 | Indolent | <i>MYD88</i> <i>MLL2</i> | 794T>C 15629A>G | L265P Y5210C | 7% 8% |
| | Transformation | <i>MYD88</i> <i>MLL2</i> | 794T>C 15629A>G | L265P Y5210C | 26% 31% |

Figure 13: Mutation de *BIRC3* décrite dans COSMIC. En dessous, la mutation identifiée dans notre série

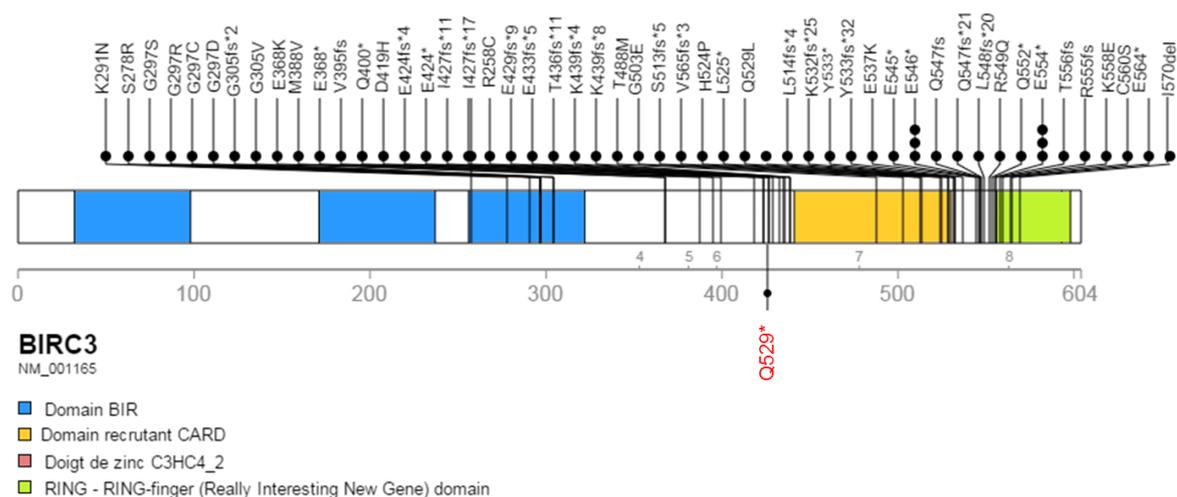
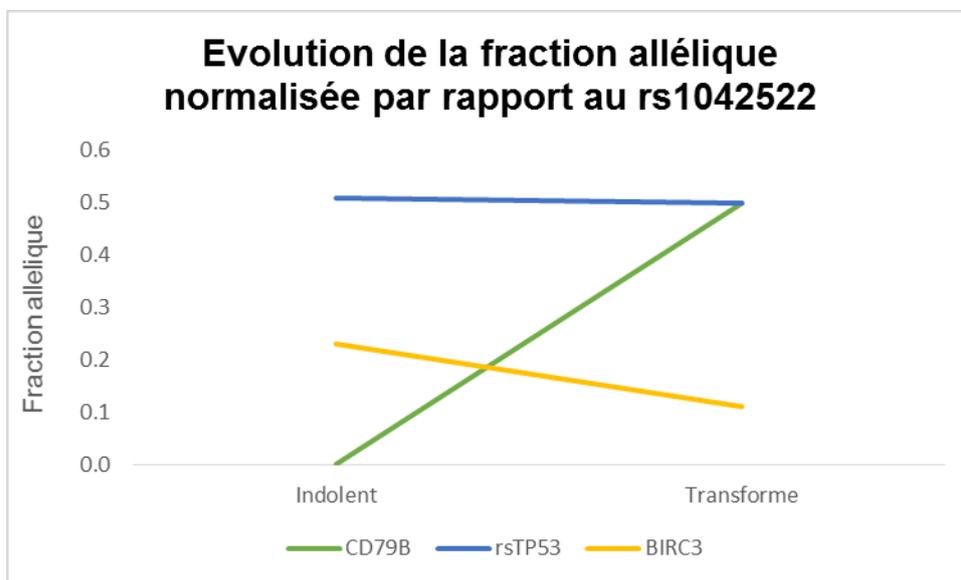


Tableau 6: Récapitulatif clinico-biologique des patients 1 à 4 (N=normaux)

| | Age au diagnostic | Sous-type | Transformation | Inaugural | Stade | LDH | Chimio sensibilité | Indolent | Transformé |
|------------------|--------------------------|------------------|-----------------------|------------------|--------------|------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
| Patient 1 | 71 | Splénique | Grande cellules B | Non | IV | N | Non | <i>CXCR4, TP53</i> | <i>CXCR4, TP53</i> |
| Patient 2 | 74 | Splénique | DLBC-nonGC | Oui | IV | N | Oui | <i>BIRC3</i> | <i>BIRC3 CD79B</i> |
| Patient 3 | 66 | Splénique | DLBC-nonGC | Oui | IV | N | Oui | <i>MYD88 MLL2</i> | <i>MYD88 MLL2</i> |
| Patient 4 | 22 | Ganglionnaire | Hodgkin | Non | IV | N | Non | <i>KLF2</i> | - |

Figure 14: Fraction allélique rapporté au polymorphisme de *TP53* rs1032522 suggérant que les deux mutations de NF-KB ne sont pas dans le même clone



DISCUSSION

I. Mutations de *KLF2*

Les difficultés de mise au point du séquençage de *KLF2* sont en partie dus à la qualité du matériel issu de prélèvements fixés et paraffinés, ayant parfois subi une décalcification. La réalisation de repli-G sur six échantillons a amélioré de manière significative le rendement des PCR de séquence de *KLF2* (à l'exception de la PCR *KLF2_2.5*, non testée) (résultats non-montrés). Ces difficultés sont aggravées par la teneur en GC et les répétitions présentes dans l'exon 2. Néanmoins, la partie C-terminale, hotspot mutationnel, **Figure 11**, a pu être étudiée chez les patients ce qui nous a permis d'identifier deux mutations faux-sens, l'une chez une patiente ayant présenté une transformation splénique (échantillon non disponible) et la deuxième chez une patiente porteuse d'une maladie de Hodgkin. Cette dernière n'a pas été retrouvée dans la forme transformée. Cela est sans doute lié à l'importance de l'infiltrat tumoral et ne permet en aucun cas de juger de la parenté entre ces deux hémopathies. Par ailleurs, nous n'avons pas mis en évidence de mutation non-sens, comme décrit dans les séries précédentes (46,47,59).

II. Rechute et mutation

Parmi les prélèvements séquentiels, aucune nouvelle mutation de *CD79A/B*, *MYD88* ou *CXCR4* n'a été mise en évidence. Cela ne va pas à l'encontre d'une évolution clonale (79) entre ces prélèvements mais s'explique probablement par le caractère très restreint de notre panel mutationnel.

III. Transformation et mutation

A. Double hit NF- κ B et transformation?

Le récepteur des lymphocytes B ou BCR est un complexe multimérique composé d'une immunoglobuline de surface associée de manière non-covalente à deux autres protéines, l'immunoglobuline A et l'immunoglobuline B indispensables à l'expression et au bon fonctionnement du BCR. L'immunoglobuline A est codée par *CD79A* en 19q13.2 et l'immunoglobuline B par *CD79B* en 17q23. Ensemble les deux protéines coopèrent pour activer une cascade de signalisation en réponse à l'activation du BCR induite par la liaison antigénique. Cette cascade de signalisation est impliquée dans le développement lymphocytaire B, principalement aux stades pro- et pre-B. Elles répriment l'activité du complexe dans les formes immatures. Elles sont impliquées dans l'activation de la voie NF- κ B par la voie canonique en recrutant et activant SYK. De manière physiologique, BIRC3 inhibe la voie NF- κ B en se liant aux TNF Receptor Associated Protein (TRAF) et empêchant ainsi la transduction du signal activateur du récepteur TNF. Sa perte de fonction est fréquente dans les hémopathies lymphoïdes B par mutation ou délétion. Elle est aussi associée à une activation constitutive de NF- κ B.

Chez notre patient (**patient 2**), il existe une mutation inactivatrice de *BIRC3* dans la forme indolente et transformé suggérant une parenté entre les deux tumeurs. Une seconde altération ou « second Hit » de la voie NF- κ B a été mise en évidence dans la forme transformée sous la forme de l'acquisition d'une mutation de *CD79B* conduisant à une atteinte de la voie canonique et non-canonique. Ces doubles atteintes sont déjà décrites dans les lymphomes cérébraux primitifs, par exemple, sous la forme de l'association de mutations de *CD79A/B* et de *MYD88* (80). Leur association pourrait offrir à la cellule tumorale un avantage en termes de prolifération et de survie (81).

Il est néanmoins difficile de déterminer si les deux mutations sont dans le même clone. La fraction allélique est à interpréter avec prudence dans cette étude compte tenu de la pureté de l'échantillon rendant les algorithmes de calcul de diversité (tel que GAUCHO) désuets. Néanmoins, normaliser les résultats par rapport à un polymorphisme nucléotidique est possible et cela suggérerait que les mutations de *BIRC3* et *CD79B* ne seraient pas mutés dans le même clone allant à l'encontre de la théorie du double hit, **Figure 14**.

B. *MYD88* et transformation

Trois patients (5 échantillons) sont porteurs d'une mutation L265P de *MYD88* sans que cela ait de lien avec une différenciation plasmocytaire. Cela souligne toute la difficulté du diagnostic entre un lymphome de la zone marginale et une maladie de Waldenström par exemple (82). La présence de ces mutations pourrait témoigner d'un plus fort potentiel évolutif de ces tumeurs mutées. Elles ont déjà été associées, entre autre, à des grades histologiques plus élevés (56). Les autres mutations de *MYD88* n'ont pas été recherchées dans ce travail.

C. CXCR4 et transformation

Les mutations du gène *CXCR4* en 2q21 ont initialement été décrites dans un déficit immunitaire constitutionnel, le syndrome de WHIM associant neutropénie, hypogammaglobulinémie et infections récurrentes et extensives au virus HPV(83). Ce gène code pour une chémokine, le CD184, corécepteur de SDF1 impliqué dans l'activité chimiotactique des lymphocytes. Les mutations de *CXCR4* constituent des mutations récurrentes dans les hémopathies lymphoïdes B. Elles sont présentes dans 27% des lymphomes lymphoplasmocytaires (84) et semblent associées à des atteintes extra-ganglionnaires (85) et des formes cliniques plus agressives (86). Elles ont également été décrites dans 7% des lymphomes de la zone marginale splénique (85,86). On les retrouve également à des faibles fréquences dans le lymphome diffus à grandes cellules B, le lymphome folliculaire (76) et le myélome (Walker BA, JCO in press). Il s'agit en général d'insertion ou de délétion entraînant un décalage du cadre de lecture, comme dans notre étude, **Figure 10**. Des mutations faux-sens ont également été décrites. Elles se traduisent par une atteinte des dix derniers acides aminés, dans le domaine C-terminal de la protéine, dit d'internalisation du récepteur en aval du domaine de liaison aux protéines G. Dans la maladie de Waldenström, ces mutations ont été associées à des résistances accrues à un inhibiteur de la Bruton Tyrosine Kinase (Btk), l'ibrutinib (87). Dans notre série, deux mutations ont été identifiées, toutes deux dans des formes spléniques et circulantes. L'un de ces patients était réfractaire à de multiples lignes thérapeutiques (y compris un inhibiteur de PI3K), avant même la transformation. Par ailleurs, cette mutation était présente aux différents stades de la maladie (diagnostic, rechute et transformation) ainsi que dans les différents sites (sang, moelle, ganglion) suggérant qu'il s'agit d'un

évènement précoce dans la lymphomagènese Cette donnée était déjà suggérée dans le myélome où la fraction clonale des mutations de *CXCR4* est proche de un suggérant que la mutation était présente dans l'ensemble des cellules de la tumeur (Walker BA, JCO in press).

D. *TP53* et transformation

Comme publié précédemment un de nos patients a présenté une mutation c.278delT de *TP53* dans une forme indolente et transformée. Les fréquences alléliques supérieure à 50% pourrait être un argument en faveur d'une perte d'hétérozygotie et une inactivation bi-allélique de *TP53*. Il est probable que cette inactivation bi-allélique ait contribué au risque de transformation sans que ce soit le seul facteur déterminant. Par analogie avec les autres hémopathies et les tumeurs solides, cela pourrait expliquer le caractère chimio-réfractaire de ce patient (88–92).

CONCLUSION

Le lymphome de la zone marginale est une hémopathie lymphoïde mature caractérisée par son profil indolent et ses rechutes fréquentes. Dans les limites de notre étude, les rechutes ne semblent pas associées à l'acquisition de mutation de *CXCR4*, *CD79A*, *CD79B*, *MYD88* ou de la partie 3' de *KLF2*.

Nous avons mis en évidence des évolutions clonales entre les prélèvements transformés et indolents par l'acquisition de mutations de *CD79B*. De manière intéressante, les autres mutations (*MYD88*, *CXCR4*, *TP53*) étaient déjà présentes dans les formes indolentes suggérant qu'elles pourraient constituer en soit des facteurs de risque de transformation plutôt que d'authentiques facteurs de transformation.

La petite taille de cette cohorte ne nous permet cependant pas d'établir des conclusions fermes et définitives.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5019–32.
2. Okosun J, Bödör C, Wang J, Araf S, Yang C-Y, Pan C, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet*. 2014 Feb;46(2):176–81.
3. Pasqualucci L, Khiabani H, Fangazio M, Vasishtha M, Messina M, Holmes AB, et al. Genetics of Follicular Lymphoma Transformation. *Cell Rep*. 2014 Jan 16;6(1):130–40.
4. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Brioli A, Johnson DC, Kaiser MF, et al. Intracлонаl heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia*. 2014 Feb;28(2):384–90.
5. Vijai J, Wang Z, Berndt SI, Skibola CF, Slager SL, de Sanjose S, et al. A genome-wide association study of marginal zone lymphoma shows association to the HLA region. *Nat Commun*. 2015;6:5751.
6. Xochelli A, Kalpadakis C, Gardiner A, Baliakas P, Vassilakopoulos TP, Mould S, et al. Clonal B-cell lymphocytosis exhibiting immunophenotypic features consistent with a marginal-zone origin: is this a distinct entity? *Blood*. 2014 Feb 20;123(8):1199–206.

7. Ganapathi KA, Pittaluga S, Odejide OO, Freedman AS, Jaffe ES. Early lymphoid lesions: conceptual, diagnostic and clinical challenges. *Haematologica*. 2014 Sep;99(9):1421–32.
8. Matolcsy A. High-grade transformation of low-grade non-Hodgkin's lymphomas: mechanisms of tumor progression. *Leuk Lymphoma*. 1999 Jul;34(3-4):251–9.
9. INVS. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012 / 2013 / Maladies chroniques et traumatismes / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil [Internet]. 2015 [cited 2015 Jun 6]. Available from: <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2013/Estimation-nationale-de-l-incidence-des-cancers-en-France-entre-1980-et-2012>
10. SEER data,. US Population data 1969-2012 - SEER Datasets [Internet]. [cited 2015 Jan 4]. Available from: <http://seer.cancer.gov/data/citation.html>
11. Liu L, Wang H, Chen Y, Rustveld L, Liu G, Du XL. Splenic marginal zone lymphoma: a population-based study on the 2001-2008 incidence and survival in the United States. *Leuk Lymphoma*. 2013 Jul;54(7):1380–6.
12. Olszewski AJ, Castillo JJ. Survival of patients with marginal zone lymphoma: analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*. 2013 Feb 1;119(3):629–38.
13. ONS. Office for National Statistics (ONS) [Internet]. Office for National Statistics. 2010 [cited 2015 Jan 4]. Available from: <http://www.ons.gov.uk/ons/index.html>
14. Thieblemont C, Bertoni F, Copie-Bergman C, Ferreri AJM, Ponzoni M. Chronic inflammation and extra-nodal marginal-zone lymphomas of MALT-type. *Semin Cancer Biol*. 2014 Feb;24:33–42.

15. Thieblemont C, Berger F, Dumontet C, Moullet I, Bouafia F, Felman P, et al. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma is a disseminated disease in one third of 158 patients analyzed. *Blood*. 2000 Feb 1;95(3):802–6.
16. Zucca E, Conconi A, Pedrinis E, Cortelazzo S, Motta T, Gospodarowicz MK, et al. Nongastric marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2489–95.
17. Mulligan SP, Matutes E, Dearden C, Catovsky D. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: natural history and response to therapy in 50 cases. *Br J Haematol*. 1991 Jun;78(2):206–9.
18. Troussard X, Mauvieux L, Radford-Weiss I, Rack K, Valensi F, Garand R, et al. Genetic analysis of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC) study. *Br J Haematol*. 1998 Jun;101(4):712–21.
19. Thieblemont C, Felman P, Berger F, Dumontet C, Arnaud P, Hequet O, et al. Treatment of splenic marginal zone B-cell lymphoma: an analysis of 81 patients. *Clin Lymphoma*. 2002 Jun;3(1):41–7.
20. Chacón JI, Mollejo M, Muñoz E, Algara P, Mateo M, Lopez L, et al. Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1648–54.
21. Nathwani BN, Anderson JR, Armitage JO, Cavalli F, Diebold J, Drachenberg MR, 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999 Aug;17(8):2486–92.
22. Berger F, Felman P, Thieblemont C, Pradier T, Baseggio L, Bryon PA, 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):1950–6.

23. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet*. 1991 Nov 9;338(8776):1175–6.
24. Lecuit M, Abachin E, Martin A, Poyart C, Pochart P, Suarez F, et al. Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *N Engl J Med*. 2004 Jan 15;350(3):239–48.
25. Ferreri AJM, Guidoboni M, Ponzoni M, De Conciliis C, Dell’Oro S, Fleischhauer K, et al. Evidence for an association between *Chlamydia psittaci* and ocular adnexal lymphomas. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Apr 21;96(8):586–94.
26. De Boer JP, Hiddink RF, Raderer M, Antonini N, Aleman BMP, Boot H, et al. Dissemination patterns in non-gastric MALT lymphoma. *Haematologica*. 2008 Feb;93(2):201–6.
27. Nieters A, Kallinowski B, Brennan P, Ott M, Maynadié M, Benavente Y, et al. Hepatitis C and risk of lymphoma: results of the European multicenter case-control study EPILYMPH. *Gastroenterology*. 2006 Dec;131(6):1879–86.
28. Audouin J, Le Tourneau A, Molina T, Camilleri-Broët S, Adida C, Comperat E, et al. Patterns of bone marrow involvement in 58 patients presenting primary splenic marginal zone lymphoma with or without circulating villous lymphocytes. *Br J Haematol*. 2003 Aug;122(3):404–12.
29. Baldini L, Fracchiolla NS, Cro LM, Trecca D, Romitti L, Polli E, et al. Frequent p53 gene involvement in splenic B-cell leukemia/lymphomas of possible marginal zone origin. *Blood*. 1994 Jul 1;84(1):270–8.
30. Giannouli S, Paterakis G, Ziakas PD, Anagnostou D, Voulgarelis M. Splenic marginal zone lymphomas with peripheral CD5 expression. *Haematologica*. 2004 Jan;89(1):113–4.

31. Chuang S-S, Liao Y-L, Chang S-T, Hsieh Y-C, Kuo S-Y, Lu C-L, et al. Hepatitis C virus infection is significantly associated with malignant lymphoma in Taiwan, particularly with nodal and splenic marginal zone lymphomas. *J Clin Pathol*. 2010 Jul;63(7):595–8.
32. Carulli G, Cannizzo E, Zucca A, Buda G, Orciuolo E, Marini A, et al. CD45 expression in low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Res*. 2008 Feb;32(2):263–7.
33. Brynes RK, Almaguer PD, Leathery KE, McCourty A, Arber DA, Medeiros LJ, et al. Numerical cytogenetic abnormalities of chromosomes 3, 7, and 12 in marginal zone B-cell lymphomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 1996 Oct;9(10):995–1000.
34. Rosenwald A, Ott G, Stilgenbauer S, Kalla J, Brecht M, Katzenberger T, et al. Exclusive detection of the t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B cell lymphomas (MZBL) of MALT type in contrast to other MZBL and extranodal large B cell lymphomas. *Am J Pathol*. 1999 Dec;155(6):1817–21.
35. Wang G, Auerbach A, Wei M, Dow N, Barry TS, Hodge L, et al. t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in stomach: a study of 48 cases. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2009 Jan;22(1):79–86.
36. Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, et al. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood*. 1999 Jun 1;93(11):3601–9.
37. Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J, Cerroni L, Stolte M, Ott G, et al. T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood*. 2003 Mar 15;101(6):2335–9.

38. Streubel B, Vinatzer U, Lamprecht A, Raderer M, Chott A. T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Leukemia*. 2005 Apr;19(4):652–8.
39. Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, et al. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell*. 1999 Jan 8;96(1):35–45.
40. Traverse-Glehen A, Bachy E, Baseggio L, Callet-Bauchu E, Gazzo S, Verney A, et al. Immunoarchitectural patterns in splenic marginal zone lymphoma: correlations with chromosomal aberrations, IGHV mutations, and survival. A study of 76 cases. *Histopathology*. 2013 May;62(6):876–93.
41. Stary S, Vinatzer U, Müllauer L, Raderer M, Birner P, Streubel B. t(11;14)(q23;q32) involving IGH and DDX6 in nodal marginal zone lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Jan;52(1):33–43.
42. Baens M, Finalet Ferreira J, Tousseyn T, Urbankova H, Michaux L, de Leval L, et al. t(X;14)(p11.4;q32.33) is recurrent in marginal zone lymphoma and up-regulates GPR34. *Haematologica*. 2012 Feb;97(2):184–8.
43. Zhu D, Orchard J, Oscier DG, Wright DH, Stevenson FK. V(H) gene analysis of splenic marginal zone lymphomas reveals diversity in mutational status and initiation of somatic mutation in vivo. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2659–61.
44. Kalpadakis C, Pangalis GA, Dimitriadou E, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Kyrtsolis M-C, et al. Mutation Analysis of IgVH Genes in Splenic Marginal Zone Lymphomas: Correlation with Clinical Characteristics and Outcome. *Anticancer Res*. 2009 May 1;29(5):1811–6.

45. Kiel MJ, Velusamy T, Betz BL, Zhao L, Weigelin HG, Chiang MY, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J Exp Med*. 2012 Aug 27;209(9):1553–65.
46. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, Bruscaggin A, Rasi S, Spina V, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med*. 2012 Aug 27;209(9):1537–51.
47. Parry M, Rose-Zerilli MJ, Ljungström V, Gibson J, Wang J, Walewska R, et al. Genetics and Prognostication in Splenic Marginal Zone Lymphoma: Revelations from Deep Sequencing. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015 Mar 16;
48. Bruscaggin A, Monti S, Arcaini L, Ramponi A, Rattotti S, Lucioni M, et al. Molecular lesions of signalling pathway genes in clonal B-cell lymphocytosis with marginal zone features. *Br J Haematol*. 2014 Dec;167(5):718–20.
49. Arcaini L, Rossi D, Lucioni M, Nicola M, Bruscaggin A, Fiaccadori V, et al. The NOTCH pathway is recurrently mutated in diffuse large B-cell lymphoma associated with hepatitis C virus infection. *Haematologica*. 2015 Feb;100(2):246–52.
50. Lobry C, Oh P, Mansour MR, Look AT, Aifantis I. Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. *Blood*. 2014 Apr 17;123(16):2451–9.
51. Conze DB, Zhao Y, Ashwell JD. Non-canonical NF- κ B activation and abnormal B cell accumulation in mice expressing ubiquitin protein ligase-inactive c-IAP2. *PLoS Biol*. 2010;8(10):e1000518.
52. Xie P, Stunz LL, Larison KD, Yang B, Bishop GA. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 is a critical regulator of B cell homeostasis in secondary lymphoid organs. *Immunity*. 2007 Aug;27(2):253–67.

53. Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Rodriguez A, Camacho FI, Algara P, Martinez N, et al. Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1831–8.
54. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009 Jun 4;459(7247):717–21.
55. Martinez-Lopez A, Curiel-Olmo S, Mollejo M, Cereceda L, Martinez N, Montes-Moreno S, et al. MYD88 (L265P) somatic mutation in marginal zone B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2015 May;39(5):644–51.
56. Trøen G, Warsame A, Delabie J. CD79B and MYD88 Mutations in Splenic Marginal Zone Lymphoma. *ISRN Oncol*. 2013;2013:252318.
57. Hoek KL, Gordy LE, Collins PL, Parekh VV, Aune TM, Joyce S, et al. Follicular B cell trafficking within the spleen actively restricts humoral immune responses. *Immunity*. 2010 Aug 27;33(2):254–65.
58. Winkelmann R, Sandrock L, Kirberg J, Jäck H-M, Schuh W. KLF2--a negative regulator of pre-B cell clonal expansion and B cell activation. *PLoS One*. 2014;9(5):e97953.
59. Clipson A, Wang M, de Leval L, Ashton-Key M, Wotherspoon A, Vassiliou G, et al. KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype. *Leukemia*. 2015 May;29(5):1177–85.
60. Du M, Peng H, Singh N, Isaacson PG, Pan L. The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood*. 1995 Dec 15;86(12):4587–93.

61. Meyer AH, Stroux A, Lerch K, Eucker J, Eitle J, Hohloch K, et al. Transformation and additional malignancies are leading risk factors for an adverse course of disease in marginal zone lymphoma. *Ann Oncol*. 2014 Jan 1;25(1):210–5.
62. Camacho FI, Mollejo M, Mateo MS, Algara P, Navas C, Hernández JM, et al. Progression to large B-cell lymphoma in splenic marginal zone lymphoma: a description of a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol*. 2001 Oct;25(10):1268–76.
63. Troppan K, Wenzl K, Neumeister P, Deutsch A. Molecular Pathogenesis of MALT Lymphoma. *Gastroenterol Res Pract*. 2015;2015:102656.
64. Cogliatti SB, Schmid U, Schumacher U, Eckert F, Hansmann ML, Hedderich J, et al. Primary B-cell gastric lymphoma: a clinicopathological study of 145 patients. *Gastroenterology*. 1991 Nov;101(5):1159–70.
65. Fung EK, Neuhauser TS, Thompson LDR. Hodgkin-like transformation of a marginal zone B-cell lymphoma of the larynx. *Ann Diagn Pathol*. 2002 Feb;6(1):61–6.
66. Kojima M, Nakamura S, Shimizu K, Tanaka H, Yamane Y, Sugihara S, et al. Classical Hodgkin lymphoma occurring in clusters of nodal marginal zone B-lymphocytes in association with progressive transformation of germinal center. A case report. *Pathol Res Pract*. 2003;199(8):547–50.
67. Chan JK, Ng CS, Isaacson PG. Relationship between high-grade lymphoma and low-grade B-cell mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALToma) of the stomach. *Am J Pathol*. 1990 May;136(5):1153–64.
68. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal Gene Signatures in Large-B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 2008 Nov 27;359(22):2313–23.
69. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010 Jan 7;463(7277):88–92.

70. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010 Jan 15;327(5963):291–5.
71. Lin S-C, Lo Y-C, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. 2010 Jun 17;465(7300):885–90.
72. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011 Feb 3;470(7332):115–9.
73. Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, Tagawa H, Nakamura S, Morishima Y, et al. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2467–75.
74. Deutsch AJA, Steinbauer E, Hofmann NA, Strunk D, Gerlza T, Beham-Schmid C, et al. Chemokine receptors in gastric MALT lymphoma: loss of CXCR4 and upregulation of CXCR7 is associated with progression to diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2013 Feb;26(2):182–94.
75. Arribas AJ, Rinaldi A, Mensah AA, Kwee I, Cascione L, Robles EF, et al. DNA methylation profiling identifies two splenic marginal zone lymphoma subgroups with different clinical and genetic features. *Blood*. 2015 Mar 19;125(12):1922–31.
76. COSMIC. COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer [Internet]. 2015 [cited 2015 Jun 6]. Available from: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
77. DoroCharite. MutationTaster [Internet]. 2015 [cited 2015 Jun 15]. Available from: <http://www.mutationtaster.org/index.html>
78. IARC TP53 Search [Internet]. 2015 [cited 2015 Jun 17]. Available from: <http://p53.iarc.fr/TP53GeneVariations.aspx>
79. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012 Jan 19;481(7381):306–13.

80. Poulain S, Boyle EM, Tricot S, Demarquette H, Doye E, Roumier C, et al. Absence of CXCR4 mutations but high incidence of double mutant in CD79A/B and MYD88 in primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol*. 2015 Feb 2;
81. Nagel D, Vincendeau M, Eitelhuber AC, Krappmann D. Mechanisms and consequences of constitutive NF- κ B activation in B-cell lymphoid malignancies. *Oncogene*. 2014 Dec 11;33(50):5655–65.
82. Poulain S, Boyle EM, Roumier C, Demarquette H, Wemeau M, Geffroy S, et al. MYD88 L265P mutation contributes to the diagnosis of Bing Neel syndrome. *Br J Haematol*. 2014 Nov;167(4):506–13.
83. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet*. 2003 May;34(1):70–4.
84. Hunter ZR, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. The genomic landscape of Waldenstrom macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood*. 2014 Mar 13;123(11):1637–46.
85. Roccaro AM, Sacco A, Jimenez C, Maiso P, Moschetta M, Mishima Y, et al. C1013G/CXCR4 acts as a driver mutation of tumor progression and modulator of drug resistance in lymphoplasmacytic lymphoma. *Blood*. 2014 Jun 26;123(26):4120–31.
86. Schmidt J, Federmann B, Schindler N, Steinhilber J, Bonzheim I, Fend F, et al. MYD88 L265P and CXCR4 mutations in lymphoplasmacytic lymphoma identify cases with high disease activity. *Br J Haematol*. 2015 Jun;169(6):795–803.
87. Treon SP, Tripsas CK, Meid K, Warren D, Varma G, Green R, et al. Ibrutinib in Previously Treated Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2015 Apr 9;372(15):1430–40.

88. Abdi J, Chen G, Chang H. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms. *Oncotarget*. 2013 Dec;4(12):2186–207.
89. Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, Dumay A, Poirot B, Porcher R, et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast Edinb Scotl*. 2013 Aug;22 Suppl 2:S27–9.
90. Brachova P, Thiel KW, Leslie KK. The consequence of oncomorphic TP53 mutations in ovarian cancer. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):19257–75.
91. Lubin J, Markowska A, Knapp P. Factors affecting response of chemotherapy in women with ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2012;33(6):644–7.
92. Hait WN, Yang J-M. The individualization of cancer therapy: the unexpected role of p53. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2006;117:85–101; discussion 10

AUTEUR : BOYLE Eileen Mary

Date de Soutenance : 23 Juin 2015

Titre de la Thèse : Recherche des mutations de *CD79A/B*, *CXCR4*, *MYD88* et *KLF2* dans les Lymphomes de la Zone Marginale indolents et transformés

Thèse - Médecine - Lille 2015

Cadre de classement : Hématologie

DES + spécialité : Hématologie option maladie du sang

Mots-clés : Lymphome de la zone marginale, Mutation, Transformation

Résumé :

Contexte : Le lymphome de la zone marginale est une hémopathie lymphoïde mature caractérisée par son profil indolent et ses rechutes fréquentes. Dans moins de 10% des cas, ces lymphomes indolents évoluent et se transforment en lymphome de haut grade de malignité. Les mécanismes de progressions et de transformations sont à ce jour mal connus. L'objectif de ce travail est de décrire un panel de mutations habituellement décrit dans les lymphomes B mature et de suivre son évolution au cours de la rechute et de la transformation.

Méthode : De l'ADN de 46 patients ont été extraits à partir de prélèvement d'anatomopathologie fixés. Pour quatorze d'entre eux nous disposons de prélèvements séquentiels obtenus lors de différentes rechutes. Pour quatre patients complémentaires, nous disposons, en plus du prélèvement « indolent » d'un prélèvement de la forme transformée. *CXCR4*, *CD79A/B* et la région 3' de *KLF2* ont été séquencé par la méthode de Sanger et la mutation L265P de *MYD88* recherchée par PCR quantitative. Une analyse complémentaire, sur trois couples d'échantillons pour lesquels nous disposons d'un échantillon de la tumeur indolente et transformée, a été réalisée par le séquençage d'un panel Ampliseq® de gènes lymphoïdes.

Résultats : Parmi les prélèvements séquentiels, aucune nouvelle mutation de *CD79A/B*, *MYD88* ou *CXCR4* n'a été mise en évidence. Nous avons mis en évidence des évolutions clonales entre les prélèvements transformés et indolents par l'acquisition d'une mutation de *CD79B*. De manière intéressante, les autres mutations (*MYD88*, *CXCR4*, *TP53*) étaient déjà présentes dans les formes indolentes suggérant qu'elles pourraient constituer en soit des facteurs de risque de transformation plutôt que d'authentiques facteurs de transformation.

Composition du Jury :

Président : Pr Thierry Facon

Assesseurs :

- **Professeur Claude Preudhomme**
- **Docteur Stephanie Poulain**
- **Professeur Franck Morschhauser**