

Oncogénèse des lymphomes B

Les lymphomes B correspondent à l'expansion d'un clone lymphocytaire B bloqué à un certain stade de maturation, à l'exception de la maladie de Waldenström pour laquelle il existe un continuum de cellules clonales comprenant des lymphocytes B, des lymphoplasmocytes et des plasmocytes. La classification OMS (pour Organisation Mondiale de la Santé), qui fait référence actuellement, tend à proposer la contrepartie normale pour une hémopathie donnée, c'est-à-dire le stade de maturation auquel la cellule est supposée correspondre¹. Le clone malin dériverait alors d'un lymphocyte B bloqué à un stade de maturation donné. Dans ce chapitre, nous allons donc revoir la physiologie normale du lymphocyte B avec son processus de maturation et les modifications opérées aux différents stades, puis nous expliquerons les principales voies d'oncogénèse identifiées dans les lymphomes B, en insistant plus particulièrement sur le mécanisme de translocation impliquant les gènes des immunoglobulines.

A- Physiologie de la maturation B normale

1- Introduction

Les lymphocytes B sont impliqués dans la réponse immunitaire adaptative². Leur rôle principal est de reconnaître les antigènes étrangers comme les agents infectieux et de produire, une fois activés, une grande quantité d'anticorps spécifiques pour permettre l'élimination de ces antigènes. Les anticorps correspondent aux immunoglobulines. Celles-ci sont constituées de chaînes lourdes et légères, dont les parties variables sont codées par différents segments appelés V (pour variable), D (pour diversité) et J (pour jonction), le segment D n'étant présent que pour les chaînes lourdes (Figure 1). Ces segments doivent subir des réarrangements génomiques pour permettre la formation de régions variables fonctionnelles². Cette structure particulière permet la production d'une importante diversité d'anticorps différents, phénomène amplifié par le processus d'hypermutation somatique au cours du développement du lymphocyte B.



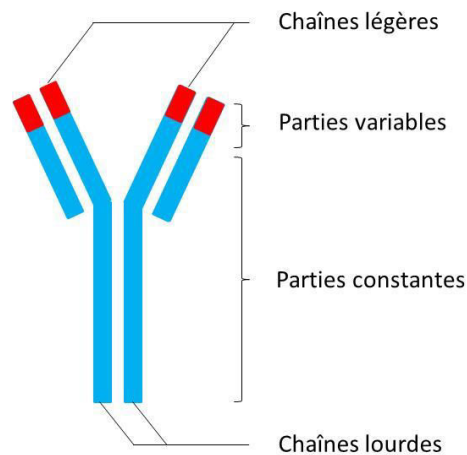


Figure 1 : Schéma d'une immunoglobuline avec en rouge les parties variables et en bleu les parties constantes

Les immunoglobulines peuvent être produites par le lymphocyte B et exprimées à la surface de celui-ci ou être libérées pour aller neutraliser des antigènes à distance³.

2- Structure des immunoglobulines

Les immunoglobulines sont constituées de deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques (Kappa ou Lambda) (Figure 1)^{3,4}.

Chaque chaîne comprend un domaine amino-terminal (-NH₂) côté variable et un domaine carboxylique (-COOH) côté constant. La structure de chacun de ces domaines est constituée de 2 feuillets β repliés en épingle grâce à un pont disulfure entre 2 résidus cystéine³. Tandis que les chaînes légères sont constituées d'un seul domaine constant, les chaînes lourdes peuvent quant à elles en contenir trois ou quatre. Lorsque les chaînes lourdes contiennent trois domaines constants (CH), les premier (CH1) et deuxième (CH2) sont séparés par un espaceur appelé charnière (« hinge ») (Figure 2).



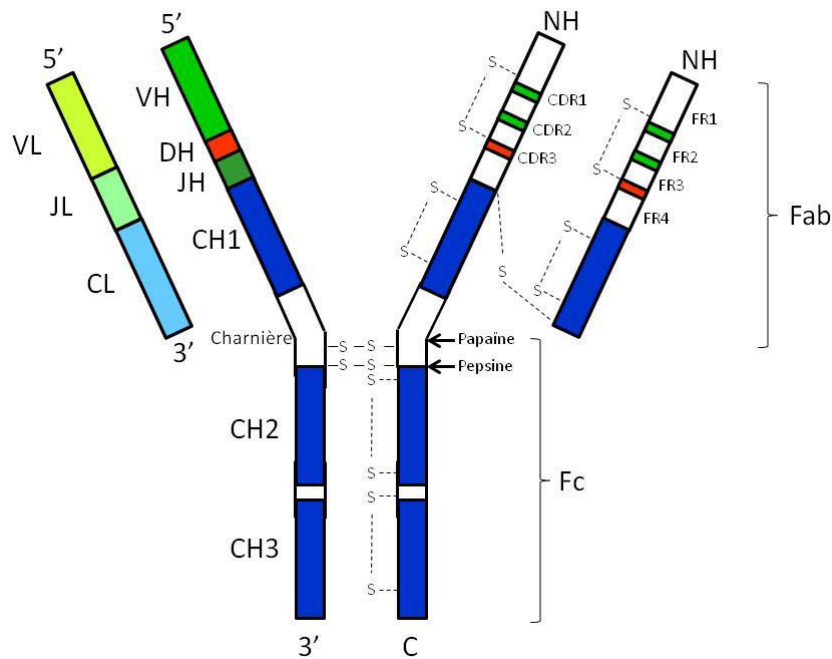


Figure 2 : Schéma détaillé d'une immunoglobuline, adapté selon Schroeder et al.³ représentant les chaînes lourdes et légères, ainsi que les différents domaines des immunoglobulines et les interactions avec ponts disulfure.

Les flèches noires correspondent au site de digestion par les enzymes Papaine ou Pepsine. (C = région carboxy-terminale ; NH = région amino-terminale).

Chaque chaîne légère est reliée à une chaîne lourde par un pont disulfure. Il existe également des liaisons non covalentes entre les régions variables lourdes et légères⁴. Les chaînes lourdes sont reliées entre elles par des ponts disulfures situés à peu près à leur moitié, et par des liaisons non covalentes au niveau des parties constantes C-terminales.

Chez l'Homme, environ 60 % des lymphocytes B expriment une chaîne légère de type Kappa et dans 40 % des cas de type Lambda².

On distingue le fragment liant l'antigène ou Fab (pour Antigen binding Fragment) et le fragment constant Fc (pour fragment cristallisable, en référence aux expériences réalisées après digestion enzymatique). Le fragment Fab permet ainsi la reconnaissance de l'antigène et est constitué d'une chaîne légère entière avec le domaine variable et le domaine constant, ainsi que d'une partie de la chaîne lourde comprenant le domaine variable et le domaine CH1. Les autres domaines CH de la chaîne lourde correspondent au fragment Fc. Deux enzymes permettent de couper entre les fragments Fab et Fc : la papaine permet la libération de chaque Fab d'une part et du Fc entier d'autre part, tandis que la pepsine entraîne la libération du dimère (Fab)₂ (c'est-à-dire des 2 Fab liés par un pont disulfure) et du fragment Fc entier.



On désigne par paratope la portion de l'immunoglobuline qui interagit avec l'antigène. A l'inverse, l'épitope, est la partie de l'antigène qui est liée à l'immunoglobuline³. Les idiotypes sont des déterminants individuels contenus dans les parties variables de l'immunoglobuline. Les allotypes correspondent à des déterminants communs à différents membres d'une même espèce (par exemple chez l'Homme) et pouvant différer d'autres sujets, à cause de polymorphismes génétiques de différents allèles³. Les isotypes sont des déterminants communs et correspondent à une portion de la région constante des immunoglobulines ; cette région permet de séparer les immunoglobulines en plusieurs classes.

3- Structure des gènes des immunoglobulines

Les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines sont codées par plusieurs gènes séparés. Le locus IGH (pour Immunoglobulin Heavy chain) est situé sur le bras long du chromosome 14 et code la chaîne lourde des immunoglobulines. Le locus *IGK* (pour Immunoglobuline Kappa) est situé sur le bras court du chromosome 2 et code la chaîne légère Kappa des immunoglobulines. Le locus *IGL* (pour Immunoglobuline Lambda) est situé sur le bras long du chromosome 22 et code la chaîne légère Lambda des immunoglobulines. Chaque locus code les parties variables et constantes par des éléments indépendants. La séquence primaire de la région variable des immunoglobulines est séparée en 3 domaines hypervariables appelés les CDR (pour Complementary Determining Region) situés entre quatre régions de séquence stable appelés FR (pour Framework Region) (Figure 2)³.

a- Réarrangement physiologique du gène des immunoglobulines

i- Recombinaison V(D)J

Chaque segment V est classiquement constitué d'un promoteur, d'un exon principal, d'un intron puis d'un autre exon qui code les trois premières FR ainsi que les CDR1, CDR2 entiers, la région amino-terminale du CDR3, et un signal de recombinaison appelé RSS (pour Recombination Signal Sequence)³.

Chaque segment J commence par son propre signal de recombinaison puis code la région carboxy-terminale du CDR3 et la FR4³.

La formation du domaine V est liée aux RSS qui sont à proximité des segments de gènes à réarranger.



Chaque RSS contient une séquence hautement conservée de 7 nucléotides ou heptamère (CACAGTG) séparé par un espaceur de 12 ou 23 nucléotides d'un nonamère (constitué de 9 nucléotides) un peu moins bien conservé (ACAAAAACC) (Figure 3). Ces espaceurs permettent de placer du même côté les heptamères et nonamères, après un ou deux tours d'hélice d'ADN, permettant ainsi une localisation spatiale favorable au réarrangement³. Chez l'Homme, au niveau du locus *IGH* par exemple, les gènes *VH* et *JH* ont des RSS avec espaceur de 23 nucléotides, tandis que les gènes *DH* ont des RSS avec espaceur de 12 nucléotides². Cela permet d'éviter le réarrangement entre 2 gènes *VH* ou directement entre *VH* et *JH*.

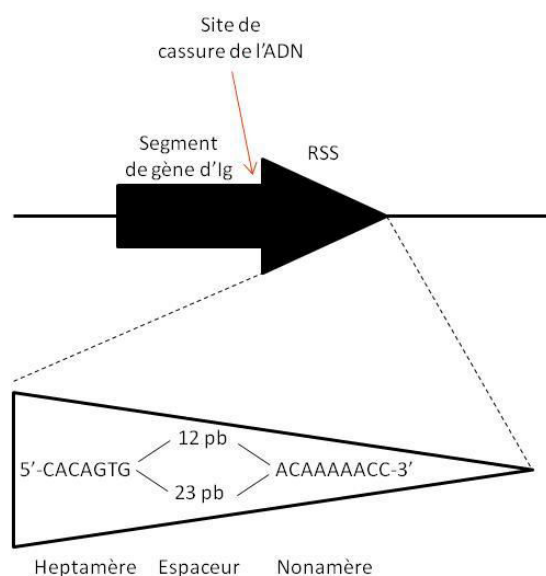


Figure 3 : Schéma d'un RSS adapté selon Schatz *et al.*⁵.

Le RSS est situé juste après le segment d'immunoglobuline et contient 2 éléments hautement conservés : l'heptamère et le nonamère séparés par un espaceur de 12 ou 23 pb.

L'initiation de la recombinaison V(D)J nécessite l'activation des gènes *RAG-1* et *RAG-2* (pour Recombination Activating Gene). Ces 2 gènes sont quasiment exclusivement exprimés dans les lymphocytes B en développement^{6,7}. Les enzymes *RAG-1* et *RAG-2* vont entraîner des cassures double-brin de l'ADN (« Double Strand Break ») à la fin du segment de gène à réarranger. Ces cassures double-brin vont ensuite être réparées par le processus de jonction d'extrémités non homologues (ou NHEJ pour Non Homologous End Joining). Le processus NHEJ permet la recombinaison précise des RSS et moins précise à la fin des régions codantes, pouvant ainsi insérer des nucléotides à la fin des régions codantes³.

Classiquement, le processus V(D)J commence par la reconnaissance par *RAG-1* d'un espaceur de 12 nucléotides, puis *RAG-2* va s'associer à *RAG-1* et l'heptamère pour former un complexe. Ensuite, un second complexe *RAG-1/RAG-2* va reconnaître un espaceur de 23 nucléotides et



s'associer au second RSS. Les 2 complexes RAG-1/RAG-2 vont pouvoir interagir. Ce processus est facilité par les protéines HMGB-1 et HMGB-2 (pour High Mobility Group Box 1 ou 2), protéines liées à la chromatine et qui permettent le repliement de l'ADN (Figure 4).

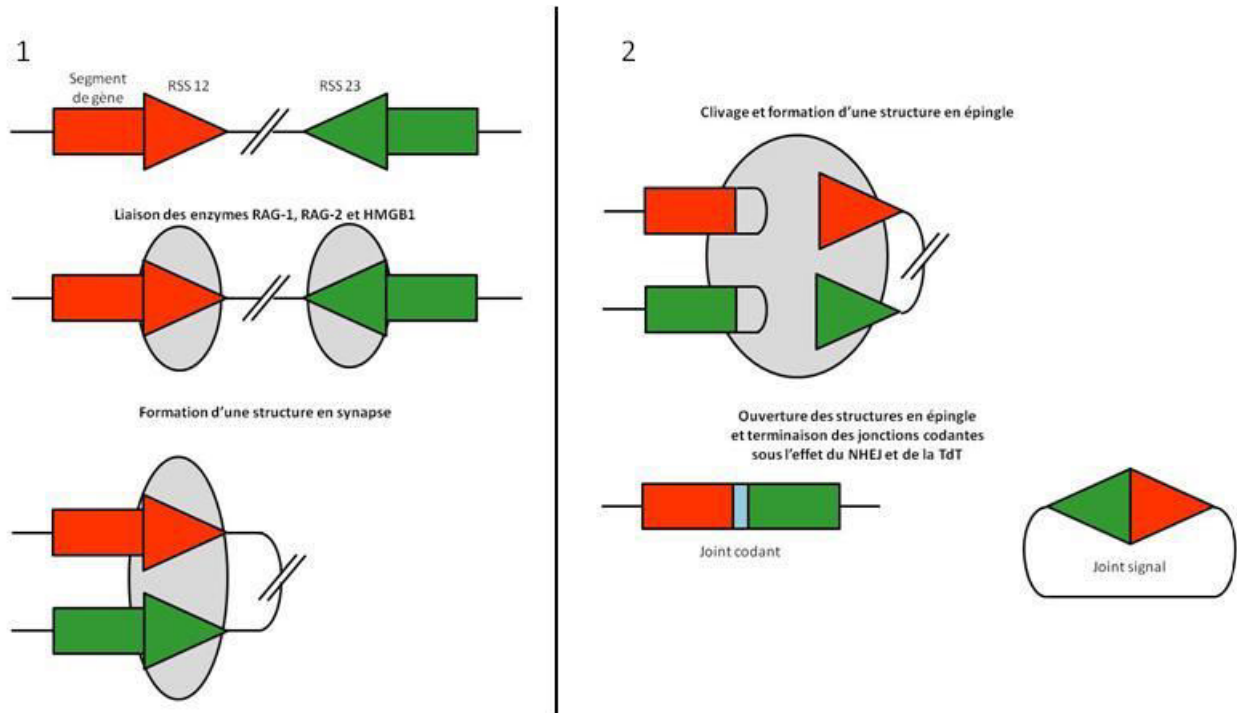


Figure 4 : Mécanisme de recombinaison VDJ entre segments RSS, adapté selon Schatz *et al.*⁵

Le double complexe RAG-1/RAG-2 formé va ensuite couper l'ADN au niveau de l'heptamère. L'extrémité 3'OH va alors se lier à l'extrémité 5'-Phosphate et créer une structure en épingle (Figure 5). La cassure à la fin des RSS permet la formation de signaux précis. Cependant, la formation de boucle en épingle après les régions codantes va nécessiter une nouvelle cassure de l'ADN, généralement au niveau des 4 à 5 derniers nucléotides de la structure en épingle. Ce phénomène peut générer quelques modifications supplémentaires. Des P-nucléotides (pour Palindromique-nucléotides) peuvent être insérés. Il s'agit de séquences palindromiques insérées aux extrémités des segments géniques⁸. Cela correspond à un ou deux nucléotides contigus au joint codant et de séquence complémentaire inverse de ce segment⁹. De plus, la TdT (pour Terminal deoxynucleotide Transferase) peut entraîner l'addition au hasard de quelques nucléotides appelés N-nucléotides (pour Non-templated nucleotides)³.



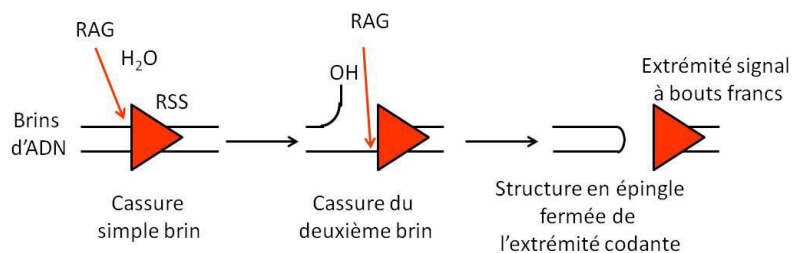


Figure 5 : Mécanisme de recombinaison VDJ : action du complexe RAG au niveau de l'ADN selon Schatz *et al.*⁵.

Les cassures double-brin ainsi générées vont alors être réparées par le processus NHEJ qui implique notamment les protéines Ku70, Ku80, XRCC4 et des protéines kinases dépendantes de l'ADN.

A cause des modifications introduites à la fin des segments de gènes réarrangés, le cadre de lecture correct, défini par le codon de départ dans le peptide leader du gène V, peut-être retenu ou perdu au cours du réarrangement V(D)J. Dans les réarrangements dits « in-frame », le segment J et le segment C suivant sont lus selon un cadre ouvert de lecture correct et peuvent donc être traduits en protéines. On parle de réarrangement productif¹⁰. Cependant, si le cadre de lecture correct est perdu, le segment C n'est pas lu et le réarrangement est dit « out of frame ». Cela génère fréquemment des codons stop prématurés dans la séquence du segment C². Dans ce cas, le réarrangement est dit non productif¹⁰. A chaque réarrangement, la probabilité d'avoir un réarrangement productif est de 1 sur 3¹⁰.

Ce processus ordonné permet le réarrangement des gènes des immunoglobulines avec production de chaînes légères et lourdes, déterminant le devenir de la cellule. Suivant le locus d'immunoglobuline, plusieurs réarrangements successifs peuvent avoir lieu (Figure 6 et Figure 20). Les spécificités de chaque locus sont décrites plus loin.



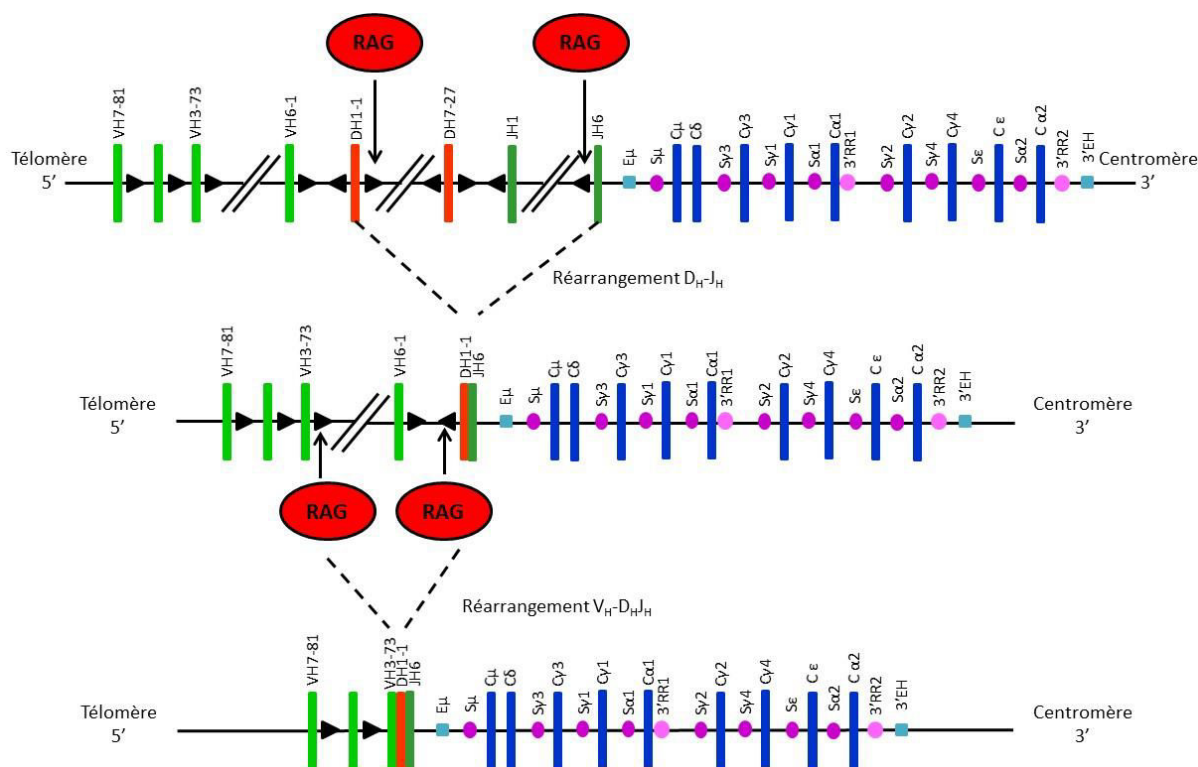


Figure 6 : Schéma de recombinaison VDJ au niveau du locus IGH avec la première étape de réarrangement entre les segments D_H et J_H, puis la deuxième étape au niveau des régions V_H-D_HJ_H sous l'action du complexe RAG (pour Recombination Activating Gene) au niveau des RSS (pour Recombination Signal Sequence).

ii- Hypermutation somatique (ou SHM pour Somatic HyperMutation)

Ce processus se produit uniquement après contact avec l'antigène. Il consiste à introduire des mutations ponctuelles au niveau de la région variable des immunoglobulines à une fréquence élevée (10^{-3} à 10^{-4} par paire de base et par division cellulaire). La région constante des gènes des immunoglobulines n'est pas touchée par ce processus. Les mutations observées sont principalement des modifications d'un seul nucléotide, le plus souvent de type transition^a, mais des délétions ou duplications de taille variable peuvent être rencontrées^{2,11}. L'apparition de délétion et duplication serait due à la génération de cassures double brin au cours de l'hypermutation somatique^{11,12}. Cela permet d'augmenter la diversité des immunoglobulines.

^a Mutation ponctuelle entraînant la substitution d'une base purique par une autre base purique (A → G ou G → A) ou d'une base pyrimidique par une autre base pyrimidique (T → C ou C → T)



Ainsi, avec l'aide des lymphocytes T, les lymphocytes B situés au niveau du centre germinatif des ganglions vont subir ce processus d'hypermutation somatique. Chez l'Homme, la première partie des SHM va concerner des hotspots mutationnels au niveau de motifs RGYW (Purine/Guanine/Pyrimidine/Adénosine), et la seconde partie va consister en l'introduction d'erreurs au niveau de l'ADN, pouvant induire des mésappariements entre brins muté et sauvage. Ainsi, l'exposition à l'antigène va entraîner des mutations permettant une maturation lymphocytaire en augmentant l'affinité pour l'antigène³.

Le processus d'hypermutation somatique peut toucher d'autres gènes que les immunoglobulines. Ainsi, il a été montré en particulier que trois gènes pouvaient être touchés à une fréquence significative. Il s'agit des gènes *BCL6*, *CD95* (ou *FAS*) et *CD79b*^{2,13,14,15,16}.

iii- Recombinaison de classe ou Class switch recombination (CSR)

La recombinaison de classe ou commutation isotypique permet de modifier la classe d'immunoglobuline produite (IgM au départ pouvant devenir IgG, IgE, IgA, IgD). Cette recombinaison se produit au niveau du locus IGH. Il existe 9 gènes constants de la chaîne lourde (*CH*) situés en aval des régions VDJ³. Ces gènes sont constitués d'une série d'exons, chacun codant un domaine CH. Chaque gène constant peut coder 2 types différents de domaines terminaux, suivant un épissage alternatif, permettant une expression de l'immunoglobuline à la surface du lymphocyte B ou bien aboutissant à sa sécrétion sous forme soluble. Chaque gène *CH* (à l'exception de *CH δ*) est précédé d'une région répétée d'ADN appelée région Switch et d'un premier exon non traduit. La recombinaison de classe a lieu entre le Switch μ et l'une des sept autres régions Switch des gènes constants (Figure 7). Ce processus permet la juxtaposition de la même chaîne variable lourde VDJ avec une autre région de chaîne lourde constante d'immunoglobuline, entraînant la délétion de la région des gènes des chaînes constantes initialement exprimées (IgM-IgD) jusqu'au switch de la chaîne lourde impliquée. Ce processus est initié par la transcription de promoteurs situés en amont des gènes *CH*¹⁷.



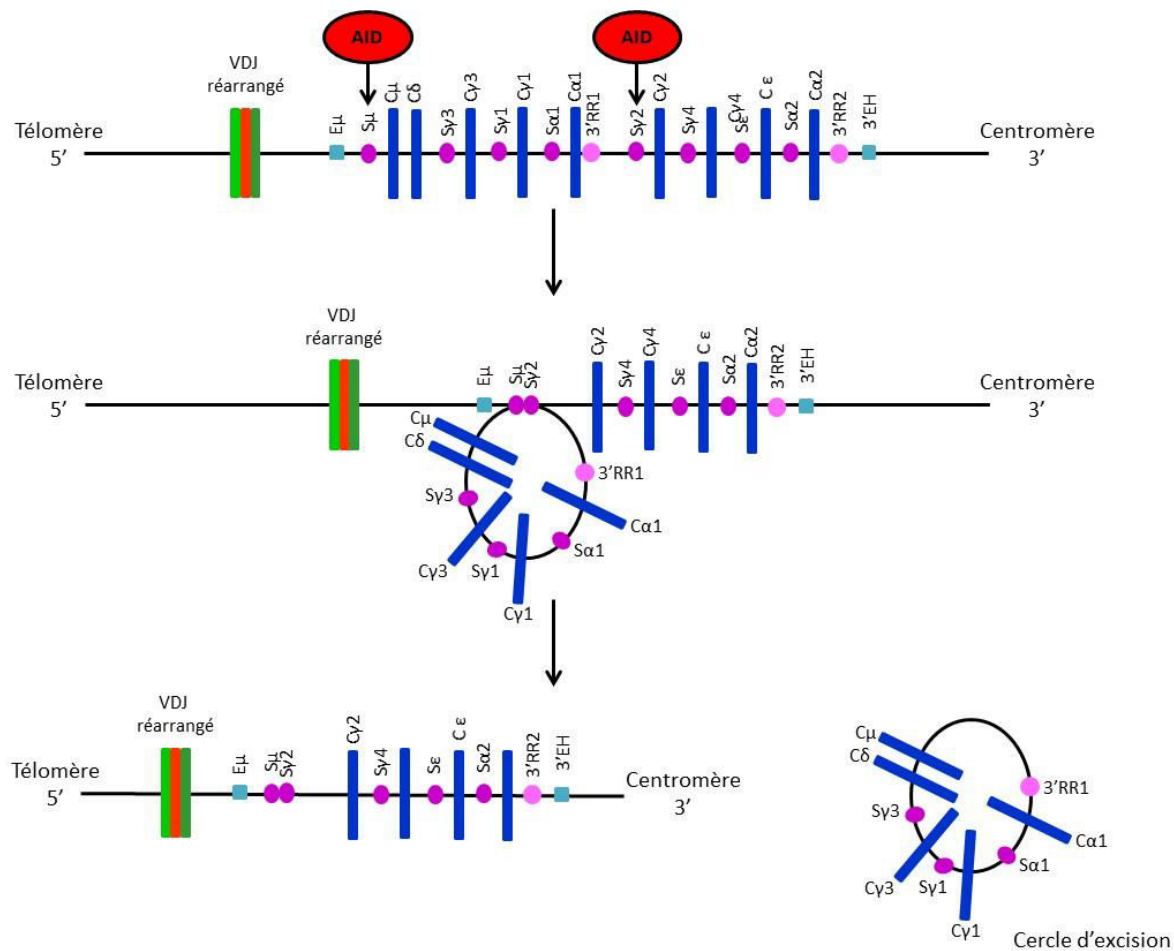


Figure 7 : Schéma de commutation de classe isotypique (ou CSR pour Class Switch Recombination) sous l'action d'AID (pour Activation-Induced Cytidine Deaminase), générant le segment d'immunoglobuline réarrangé et un cercle d'excision correspondant à la région coupée.

iv- Le rôle de l'enzyme AID (pour Activation-Induced Cytidine Deaminase)

L'enzyme AID joue un rôle clé dans les phases de recombinaison de classe et d'hypermutation somatique au niveau des centres germinatifs des ganglions. Le rôle clé d'AID dans ces deux processus a été mis en évidence d'une part par le fait qu'un déficit en AID entraîne le syndrome d'hyperIgM autosomique récessif caractérisé par un manque de recombinaison de classe isotypique et d'hypermutation somatique, et d'autre part par le fait qu'une expression ectopique d'AID est suffisante pour causer l'hypermutation somatique et la commutation de classe au niveau de structures transgéniques dans les cellules B^{18,19,20}. Il s'agit d'une enzyme ADN-simple brin, c'est-à-dire qu'elle ne va interagir qu'avec un seul brin d'ADN. Lors de la transcription d'un domaine V ou d'une région Switch d'un gène constant, le brin d'ADN sens



va être ouvert. AID peut alors venir agir et désaminer une Cytidine en Uracile, aboutissant ensuite à des mésappariements désoxyUridine/désoxyGuanosine. Le système de réparation par excision de base (ou « base excision repair ») via l'enzyme Uracyl-DNA glycosylase va enlever cette base. Enfin, les systèmes de réparation de l'ADN vont permettre d'aboutir soit à la recombinaison de classe, soit à l'hypermutation somatique. Les protéines MSH2 et MSH6 (pour MutS Homolog 2 ou 6) appartenant au système de réparation des mésappariements (ou « mismatch repair ») peuvent également intervenir au niveau des mésappariements désoxyUridine/désoxyGuanosine (Figure 8).

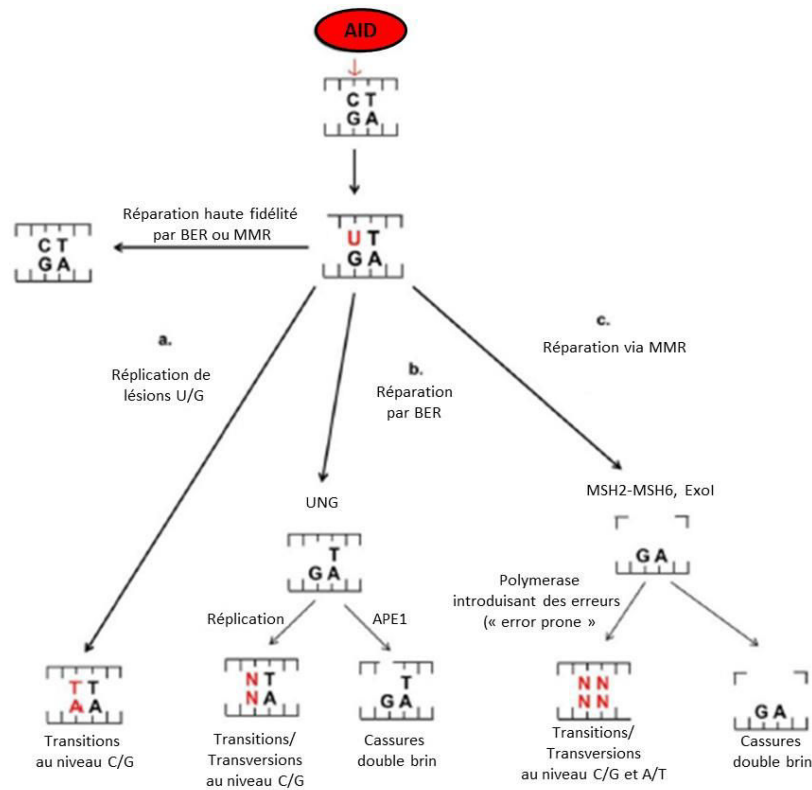


Figure 8 : Mécanisme de désamination de cytidine via AID dans les processus de SHM et CSR d'après Hwang *et al.*²¹.

AID désamine une Cytidine (C) en Uracile (U). La lésion U/G peut être réparée de façon fidèle via les systèmes de réparation d'excision de base (BER pour Base Excision Repair) ou de réparation de mésappariement (MMR pour Mismatch Repair). Les systèmes de réparation peuvent générer des modifications : a. La réplication au niveau U/G entraîne une transition. b. L'Uracil-DNA-Glycosylase (UNG) du système BER coupe la base U, créant un site apurinique/aprimidinique ou AP, et la réplication entraîne une transition ou une transversion au niveau C/G. N représente une base parmi A,T,G,C. AP endonucléase 1 (APE1) peut entraîner une cassure à ce niveau et générer une cassure double brin. c. MSH2-MSH6 du système MMR reconnaît le mésappariement U/G et Exo1 va couper ce site. Une polymérase introduisant des erreurs (ou « error prone polymerase ») va resynthétiser l'ADN au niveau de ce site en générant des mutations au niveau A/T également. Il peut aussi y avoir la génération de cassure double brin.



b- Locus IGH

Le locus *Immunoglobulin Heavy* ou *IGH* est situé sur le bras long du chromosome 14 en 14q32.33. Il s'étend sur environ 1250 kb²². Il s'agit du locus d'immunoglobuline le plus complexe. Il est antisens sur le chromosome 14 (c'est-à-dire que la partie 5' est située du côté télomérique et que la région 3' est localisée du côté centromérique (Figure 9). Il comprend environ 80 segments VH différents situés à proximité du télomère du chromosome 14³. Ces différents segments sont regroupés en 7 familles. A la suite de la région VH se trouvent les segments DH. Il en existe 27 chez l'Homme. On trouve ensuite les 6 segments JH (Figure 10). Chaque segment VH et JH est accolé à un RSS dit « deux tours », soit avec un espaceur de 23 pb, tandis que les segments DH sont entourés de part et d'autre par un RSS dit « un tour », soit avec un espaceur de 12 pb³. Cette structure permet d'éviter les mauvais réarrangements entre segments V et J directement.

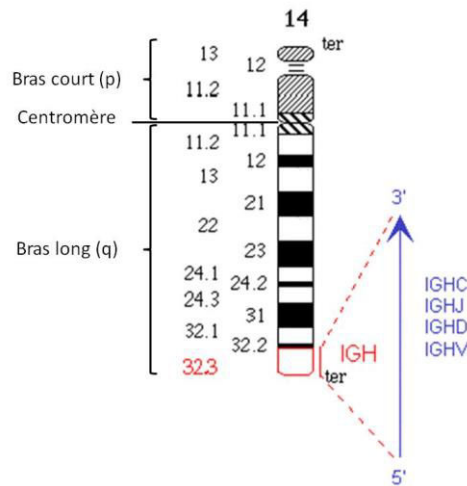


Figure 9 : Représentation du chromosome 14 avec localisation du locus IGH, adapté d'après Lefranc *et al.*²².

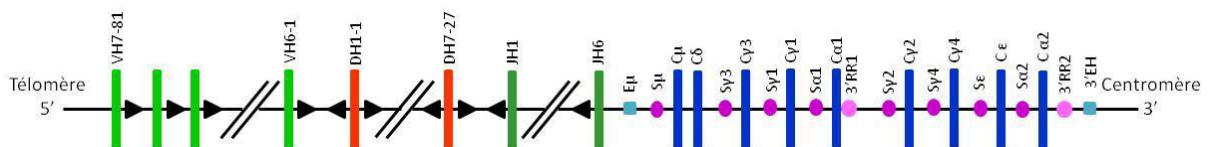


Figure 10 : Schéma simplifié du locus IGH en 14q32, adapté d'après Schroeder *et al.*, Van Dongen *et al.*, et Pinaud *et al.*^{3,23,24}.

Les flèches noires représentent les RSS. Les ronds violets indiquent les régions Switch. Les ronds roses représentent les 3'RR (pour 3' Regulatory Region). Enfin, les carrés bleus indiquent les régions enhancer.



La recombinaison VDJ au niveau du locus *IGH* débute par la recombinaison DH-JH, puis le segment VH est relié au segment DJ créé (Figure 6). Le segment V codera les portions FR1, FR2 et FR3, CDR1, CDR2 et la partie amino-terminale du CDR3. Le segment D codera le milieu du CDR3. Le segment J contient la partie carboxy-terminale du CDR3 et le FR4. La recombinaison possible entre la cinquantaine de segments V actifs, les 27 D et les 6 J permet la potentielle formation de 10^4 combinaisons VDJ différentes³. En plus de cela, il existe plusieurs mécanismes entraînant une diversité jonctionnelle au niveau VDJ. Tout d'abord, chaque segment DH peut se réarranger avec des phénomènes de délétion et d'inversion, et être épissé et traduit suivant 3 cadres de lecture. Ainsi, 6 segments différents pour chaque DH peuvent être produits. Ensuite, au moment du réarrangement, il y a création d'une cassure avec structure en épingle dont le clivage va aboutir à la formation de région palindromique appelée jonction P. De plus, les extrémités des segments réarrangés peuvent perdre un ou plusieurs nucléotides au cours du processus de recombinaison. Enfin, la TdT peut entraîner l'addition au hasard ou le remplacement de plusieurs nucléotides entre les segments V et D ou D et J générant ainsi la N-diversité (Figure 11). L'ensemble de ces processus va entraîner la formation d'une région VDJ réarrangée de structure et de taille variables, avec plus de 10^{10} combinaisons possibles. L'association par la suite avec les chaînes légères réarrangées entraîne 10^{16} combinaisons possibles avant sélection puis modification sous l'influence de l'exposition à l'antigène³.

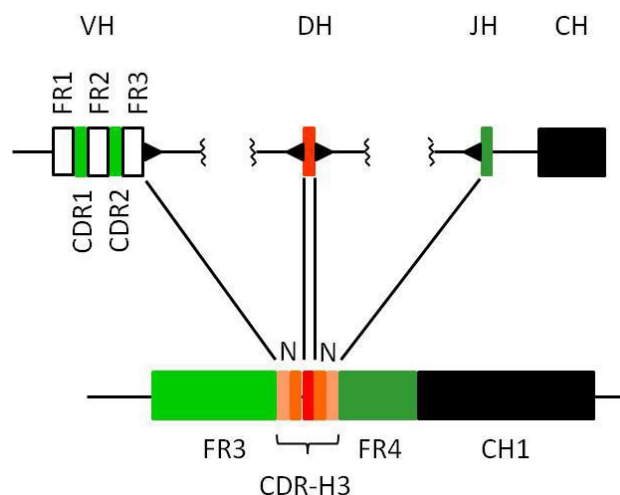


Figure 11 : Segment IGH réarrangé et diversité jonctionnelle, adapté d'après Schroeder *et al.*⁵. En orange, les régions d'introduction de nucléotides au cours du réarrangement VDJ (orange clair : insertion région codante VH ou JH et orange foncé : insertion région codante DH).

En aval des régions VDJ se situent les régions constantes CH, côté centromérique du chromosome 14 (Figure 10)²². Il existe 11 segments IGHC différents : il s'agit des gènes IGHM, IGHD, IGHG3, IGHG1, IGHEP1, IGHA1, IGHP, IGHG2, IGHG4, IGHE et IGHA2. Hormis IGHP et



IGHEP1 qui sont respectivement un ORF^a (pour Open Reading Frame) et un pseudogène^b, les 9 autres sont des gènes fonctionnels²².

A noter qu'il existe des orphons^c, c'est-à-dire des gènes *IGH* localisés en dehors du locus *IGH* en 14q32.33. Ils sont localisés en 15q11.2, 16p11.2, 9p24.2-p24.1 et 21p11.2^{22,25}.

c- Locus IGK

Le locus Immunoglobuline Kappa (IGK) est situé sur le bras court du chromosome 2 en 2p11.2 (Figure 12). Ce locus fait environ 1820 kb²⁶.

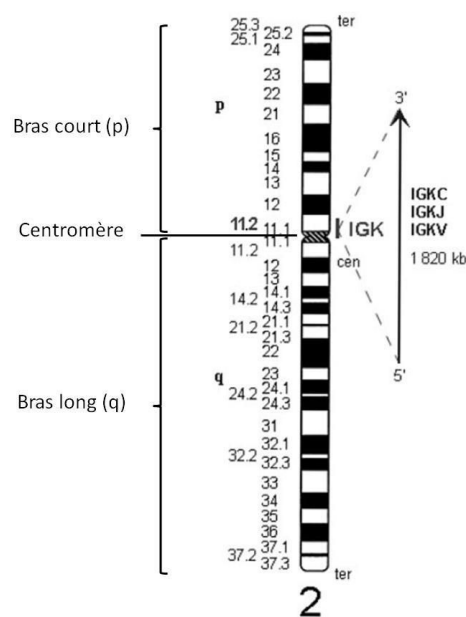


Figure 12 : Représentation du chromosome 2 avec localisation du locus IGK, adapté d'après Lefranc *et al.*²⁶.

^a ORF = Cadre de lecture ouvert c'est-à-dire succession de codons significants pour une séquence codante

^b Pseudogène = séquence non exprimée d'ADN présentant une grande homologie avec un gène actif, dont il dérive par duplication, mutation ou encore rétrotranscription

^c Orphon = Gène non fonctionnel correspondant à un pseudogène ou un ORF situé dans une région chromosomique différente du locus principal



La région variable de la chaîne légère Kappa sera codée par le réarrangement entre les segments V_k et J_k , tandis que la région constante sera codée par un seul exon C_k . Le locus IGK comprend 76 V_k et 5 J_k différents, situés en amont des régions constantes C_k ²⁶. Environ un tiers des segments V_k contiennent des mutations frameshift ou générant des codons stop, les rendant inutilisables pour la formation de protéines fonctionnelles³. Moins de 30 segments V_k différents ont été retrouvés dans des immunoglobulines fonctionnelles. Ils sont regroupés en 7 familles basées sur des similarités de séquence et de structure^{3,26}. Les segments V_k sont dispersés selon deux clusters dupliqués : le premier situé directement en amont des segments J_k présente une orientation identique à celle des segment V_k , tandis que le deuxième situé encore plus en amont présente une orientation inversée (segments D_k) (Figure 13)²³.

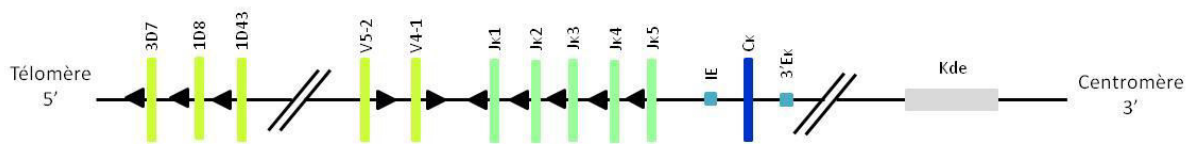


Figure 13 : Schéma simplifié du locus IGK en 2p11.2, adapté selon Schroeder et al. et Van Dongen et al.^{3,23}.

Les flèches noires indiquent les RSS. Les carrés bleus représentent les enhancers (avec IE pour enhancer intronique et 3'Ek pour Enhancer 3' Kappa). Le segment gris représente la région Kde (pour Kappa deleting element).

La recombinaison V_k - J_k entraîne la formation de 140 combinaisons possibles. Le segment V_k code les régions CDR1, CDR2, et la partie amino-terminale du CDR3, ainsi que les FR1, FR2 et FR3. Le segment J_k code la partie carboxy-terminale du CDR3 et le FR4. L'extrémité de chaque segment réarrangé peut perdre 1 à 5 nucléotides au cours du processus. De plus, la TdT peut introduire un ou plusieurs nucléotides pour remplacer l'un ou l'ensemble des nucléotides enlevés au cours du réarrangement, ou ajouter de façon aléatoire plusieurs nucléotides à la séquence originale. Ces processus permettent une diversité jonctionnelle 20 fois supérieure. Cette diversité se situe donc au niveau du CDR3.

Il existe également un segment appelé Kde (pour Kappa deleting element) situé approximativement 24 kb en aval de C_k , pouvant être impliqué dans des réarrangements V_k -Kde, ainsi qu'un RSS isolé au niveau de l'intron J_k - C_k (intron RSS-Kde)²³. Les réarrangements impliquant ces deux régions entraîneront une inactivation fonctionnelle de l'allèle κ .

Il existe des orphons *IGK* en dehors du locus IGK. Ils sont localisés en 1q21.1, 2p11.1, 2q11.2, 2q12-14, 9q12, 9q13, 10q11.21, 22q11, Yq11.21 et sur le chromosome 15^{26,27}.



d- Locus IGL

Le locus Immunoglobuline Lambda (ou IGL) est localisé sur le bras long du chromosome 22 en 22q11.2. Le locus fait environ 1050 kb²⁸. L'orientation du gène *IGL* est sens, c'est-à-dire que la région 5' est située côté centromérique et la partie 3' est localisée au niveau télomérique (Figure 14). Il contient 4 à 5 segments C λ fonctionnels précédés du segment J λ correspondant (Figure 15)^{3,28}. Les segments V λ sont regroupés en 3 clusters différents contenant des membres de différentes familles de V λ ³. En fonction des haplotypes existants, on recense environ 30 à 36 gènes V λ fonctionnels et un nombre équivalent de pseudogènes. Il existe également au niveau de ce locus des gènes codant des pseudo-chaînes légères ψ LC. Il s'agit des gènes *V_{préB}* et *λ 14.1* (ou *λ 5*). L'expression de ces 2 gènes entraîne la formation de pseudo-chaînes légères ayant une grande homologie avec les chaînes Lambda. Ces gènes s'expriment au cours des stades précoces du développement B³. Ces pseudo-chaînes légères s'associent avec les chaînes lourdes pour former le récepteur pré-B.

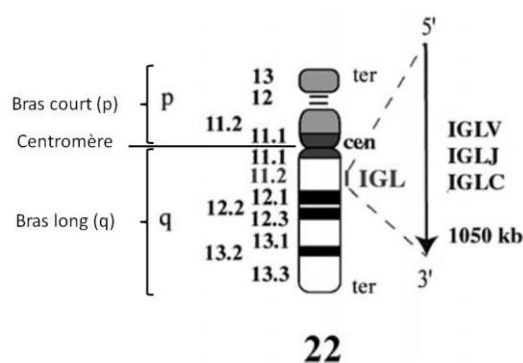


Figure 14 : Représentation du chromosome 22 avec localisation du locus IGL, adapté d'après Lefranc *et al.*²⁸.

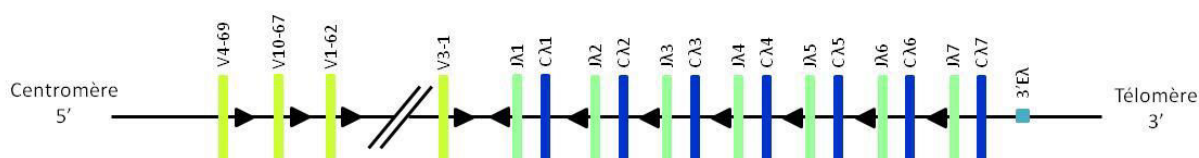


Figure 15 : Schéma simplifié du locus IGL en 22q11.2, adapté selon Schroeder *et al.* et Van Dongen *et al.*^{3,23}.

Les flèches représentent les RSS. Le carré bleu représente l'enhancer en 3'.

Il existe des orphons *IGL* en dehors du locus *IGL* en 22q11.2. Ils sont localisés en 8q11.2, 18p11 et 22q12^{28,29}.



4- Le récepteur de la cellule B ou BCR

a- Structure du BCR

Le lymphocyte B est caractérisé par l'expression à sa surface d'un récepteur spécifique capable de reconnaître et d'interagir avec l'antigène : le récepteur B ou BCR (pour B-Cell Receptor).

Il s'agit d'un complexe transmembranaire qui contrôle le devenir de la cellule depuis les stades précoces de la différenciation lymphocytaire B³⁰. Il va guider la maturation cellulaire, la survie, l'anergie et la production d'anticorps dans les plasmocytes.

Le BCR est constitué d'une immunoglobuline de surface issue du réarrangement des gènes des immunoglobulines, ce qui permet de produire un site de liaison à l'antigène unique.

Le BCR est connecté à un réseau de kinases et phosphatases qui ajustent et amplifient son activation. L'immunoglobuline de surface n'a pas d'activité kinase par elle-même, mais via son couplage avec l'hétérodimère composé des protéines Ig α et Ig β (CD79A et CD79B respectivement) (Figure 16). Chacune de ces sous-unités CD79A et CD79B contient un immunorécepteur à motif d'activation basé sur les tyrosines (ITAM pour Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) composé de deux résidus tyrosine conservés³⁰.

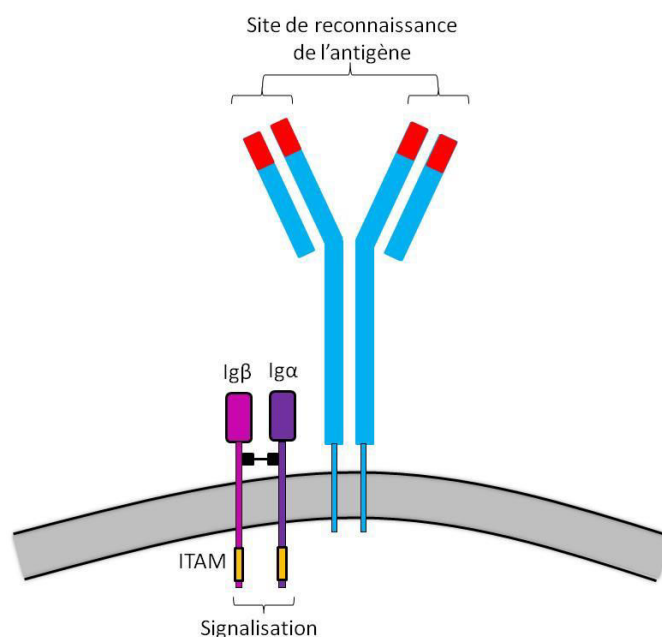


Figure 16 : Représentation du récepteur de la cellule B (BCR), adapté selon Immunologie, Janeway, De Boeck, 2009⁸.

BCR constitué de l'immunoglobuline de surface et des protéines Ig α et Ig β reliées entre elles par des ponts disulfures (en noir) et dont les domaines ITAM (en orange) permettent la signalisation.



b- Principales voies de signalisation induites par le BCR

L'agrégation du BCR et son changement de conformation induits par l'antigène entraînent la phosphorylation des ITAMs via la kinase LYN (pour Lyn proto-oncogene, Src family tyrosine kinase), provoquant la cascade d'activation du BCR (Figure 17)³⁰. Cette phosphorylation crée des sites d'ancrage pour les protéines contenant des domaines SH-2, telles que SYK (pour Spleen Tyrosine Kinase) et un recrutement accru de la kinase LYN. D'autres tyrosine kinases telles que FYN et BLK contribuent également à ce processus³⁰. On parle de kinases de la famille SRC (SFK pour SRC Family Kinases)³¹.

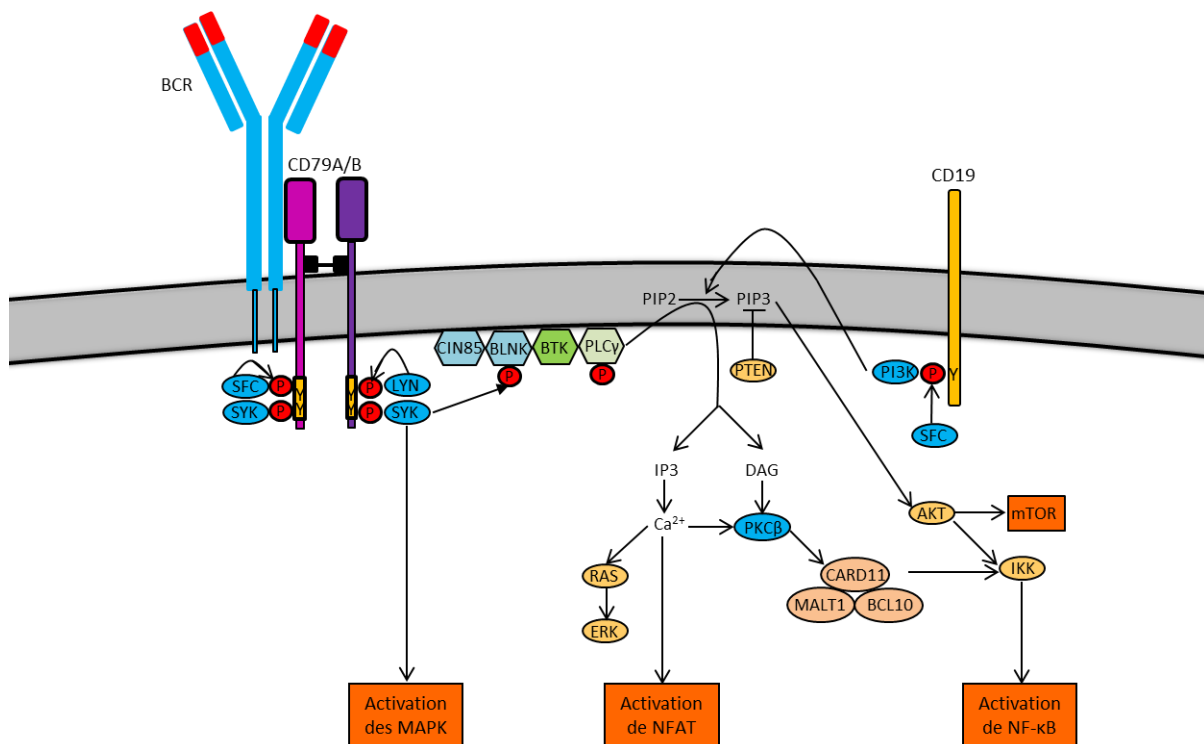


Figure 17 : Représentation schématique de la voie de signalisation du BCR adapté d'après Seda *et al.* et Young et Staudt^{30,31}.

Les protéines SYK et BTK (pour Bruton Tyrosine Kinase) sont essentielles pour la signalisation : SYK va recruter le complexe BLNK (pour B-cell linker protein) et CIN85 (pour Cbl Interacting protein of 85 kD) et activer BTK. L'absence de BTK ou une protéine non fonctionnelle va entraîner la mort du lymphocyte³⁰. L'activation de BTK dépend de la phosphorylation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) par SYK. Cette phosphorylation est nécessaire pour la liaison de la PI3K au niveau de la membrane cellulaire, à proximité de ses substrats. Cette liaison de la PI3K est assurée par son association à différentes protéines qui serviront de sites



d'ancrage³⁰. CD19, BCAP (pour B-Cell Adaptor for PI3K) et GAB1/2 (pour GRB2-associated-binding protein 1 et 2) sont des protéines d'ancrage du PI3K phosphorylé. Elles permettent le recrutement et l'assemblage du signalosome du BCR, et l'amplification du signal. La phosphorylation de la PI3K peut court-circuiter SYK et passer directement par la liaison de LYN à la PI3K, mais dans ce cas l'activité de la PI3K n'est que faiblement augmentée³⁰. La PI3K activée va phosphoryler le phosphatidylinositide biphosphate (PIP2), créant un deuxième messenger (PIP3) servant de site d'ancrage pour recruter d'autres effecteurs tels que BTK, AKT, PLC γ (pour Phospholipase C γ) et PKC β (pour Protéine Kinase C β). La BTK joue un rôle crucial dans le développement lymphocytaire B et des mutations héréditaires du gène sont responsables de l'agammaglobulinémie de Bruton ou agammaglobulinémie liée à l'X. Il existe également des inhibiteurs de BTK administrables dans le traitement de certains lymphomes dont la LLC. La PLC γ va cliver PIP2 en diacylglycérol (DAG) et IP3 (inositol triphosphate, ce qui entraîne une augmentation du calcium intracellulaire. La combinaison de l'augmentation du calcium intracellulaire et la présence de DAG va permettre l'activation de la PKC β qui va phosphoryler différents substrats. L'activation du BCR va agir sur d'autres voies de signalisation comme la voie ERK/MAPK (pour Extracellular signal-regulated kinase et Mitogen Activated Protein kinases), NF κ B (pour Nuclear Factor-Kappa B), mTOR (pour mammalian Target Of Rapamycin), RAS et NFAT (pour Nuclear Factor of Activated T-cells)³⁰. Par exemple, le recrutement de la PKC β va entraîner l'activation de CARD11 (pour Caspase recruitment Domain-containing protein 11) par phosphorylation. Cette dernière va coordonner un complexe de signalisation aboutissant à l'activation de la voie NF κ B³¹.

LYN joue également un rôle régulateur en effectuant un rétrocontrôle négatif sur l'activation du BCR via des phosphatases : elle va phosphoryler des immunorécepteurs à motifs inhibiteurs basés sur des tyrosines ou ITIM (pour Immunoreceptor Tyrosine-based Motifs) au niveau du CD22 ou du Fc γ RIIb. Ces deux molécules vont servir de point d'ancrage pour PTEN (pour Phosphatase and Tensin homolog) et SHIP1/2 (pour SH2-containing Inositol 5' Polyphosphatase 1 et 2) qui vont enlever un 3'Phosphate à PIP3 et ainsi atténuer la voie de signalisation en aval de la PI3K. Cette voie inhibitrice est aussi activée en cas de contact prolongé avec des auto-antigènes et permet d'éliminer les B auto-réactifs ou de les maintenir sous forme anergique³¹. Par ailleurs, la molécule CD45 va contrôler l'activité de LYN en enlevant une phosphorylation inhibitrice (au niveau de la tyrosine 508), qui peut être rétablie par la CSK (pour C-terminal src tyrosine kinase).

Cette voie de signalisation peut être modulée selon le stade de maturation de la cellule et sa localisation (sang, ganglion...). Les lymphocytes B mémoires ayant réalisé la commutation de classe isotypique vers une IgG vont présenter une queue cytoplasmique plus longue de l'immunoglobuline, ce qui permet de propager la voie de signalisation du BCR et d'augmenter la réponse précoce à l'antigène³⁰. Dans les cellules B matures n'ayant pas encore rencontré l'antigène, la signalisation du BCR serait maintenue dans un état basal dit « tonique »³⁰.



5- Lymphopoïèse B normale

La maturation normale des lymphocytes B prend naissance au niveau des organes lymphoïdes primaires, à savoir la moelle osseuse pour la lignée B. Comme l'ensemble des cellules hématopoïétiques, les lymphocytes B dérivent des cellules souches hématopoïétiques après engagement de celles-ci vers la lignée B. Cette première phase va aboutir à la formation de récepteurs B spécifiques : le BCR¹⁰. La maturation finale aura lieu au niveau des organes lymphoïdes secondaires représentés par les ganglions, la rate et le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT pour Mucosa Associated Lymphoid Tissue). Cette phase aura lieu lorsque la cellule B aura rencontré l'antigène¹⁰. Les stades terminaux de maturation sont représentés par les lymphocytes B mémoire permettant de réagir plus rapidement face à un antigène connu, ou par les plasmocytes produisant les anticorps.

a- Phase indépendante de l'antigène

Les lymphocytes B sont produits dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH)^{2,32}. A partir d'une cellule souche hématopoïétique vont dériver des cellules précurseurs engagées dans le lignage lymphoïde. Ce sont les progéniteurs multipotents lymphoïdes (ou Lymphoid-primed Multipotent Progenitor ou LMPP) puis les progéniteurs lymphoïdes communs (ou CLP). Ces cellules vont ensuite pouvoir s'engager vers la lignée B. Le développement des stades précoces des lymphocytes B est régi par le réarrangement ordonné des gènes des immunoglobulines, et la sélection des cellules à différents stades de développement pour obtenir des récepteurs fonctionnels (Figure 18).

Les cellules stromales assurent le développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse en établissant des interactions spécifiques à la surface des cellules B via des molécules d'adhérence et leurs ligands, et en produisant des facteurs de croissance tels que le SCF (pour Stem Cell Factor) reconnu par le récepteur Kit des cellules B immatures ou l'interleukine 7 (IL7) qui agit sur les cellules pro-B tardives et pré-B¹⁰. Les différents stades de maturation sont caractérisés par l'expression différentielle de marqueurs, permettant leur identification par cytométrie en flux (Figure 19).



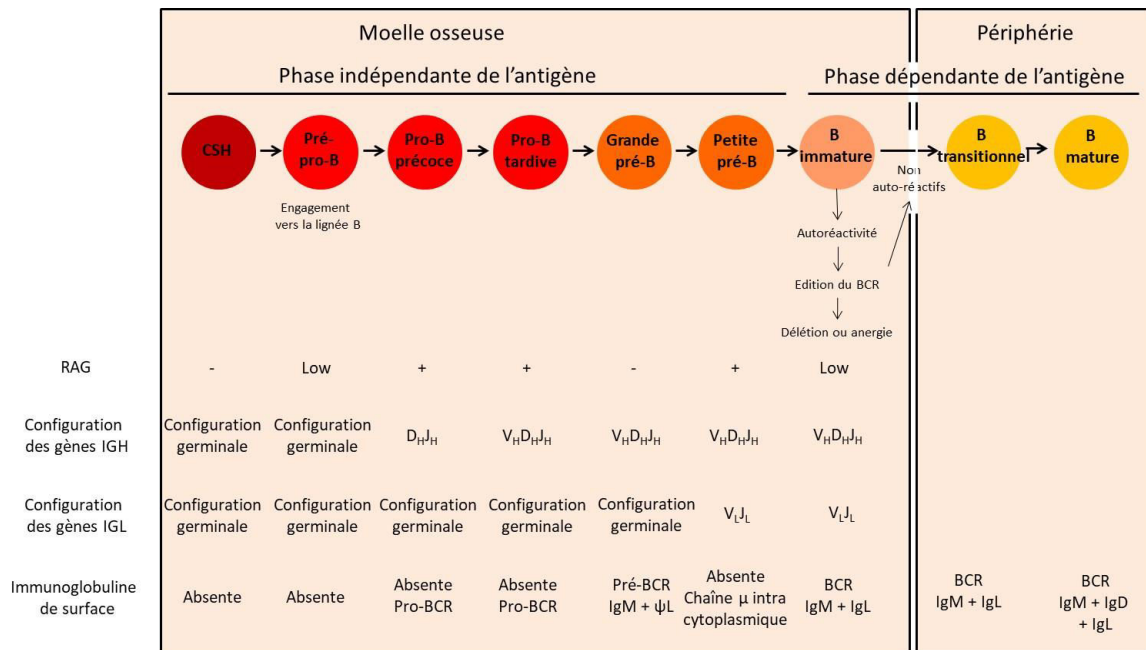


Figure 18 : Maturation lymphocytaire B précoce adapté selon Meffre *et al.* et Le système immunitaire, De Boeck^{33,10}.

Marqueur	Stade médullaire						Stade périphérique			
	CSH	pré-pro-B	pro-B	pré-BI	pré-BII	Cellule B immature	Cellule B mature			Plasmocyte
							naïve	activée	mémoire	
CD34	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CD10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
IL7Rα	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CD19	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CD79a	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TdT	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
sIgM	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
sIgD	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CD20	-	-	+/-	+	+	+	+	+	+	-
CD27	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CD138	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
CD38	+	+	+	+	+	+	+faible	+	-	+

Figure 19 : Expression des marqueurs immunophénotypiques au cours des différents stades de développement de la cellule B, adapté d'après Armitage *et al.*, Ye et Graf, et LeBien et Fates^{2,34,35}.



i- Les stades précoces de cellule souche hématopoïétique et progéniteurs

Au stade de CSH, l'expression des facteurs de transcription Ikaros, PU.1 (pour Purine box factor 1) et E2A (pour Immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47 ou TCF3 pour Transcription factor 3) participe au développement des stades précoces de la lignée B⁴. Ikaros joue un rôle dans le remodelage de la chromatine au niveau de régions spécifiques de l'ADN, permettant une conformation accessible au niveau des gènes impliqués dans le développement des cellules B. Le niveau d'expression de PU.1 permet d'orienter la cellule vers le lignage lymphoïde (en cas de faible expression) ou myéloïde (en cas de forte expression). Son niveau d'expression est régulé par le répresseur transcriptionnel Gfi1 (pour Growth factor independent 1 transcription repressor)⁴. E2A joue un rôle dans le maintien des CSH et régule leur cycle cellulaire. Les CSH expriment à leur surface la molécule c-kit (CD117).

Après le passage par le stade de progéniteur multipotent, les cellules vont pouvoir s'engager vers le lignage lymphoïde. C'est le stade LMPP. La cellule exprime alors le récepteur fms-related tyrosine kinase 3 (flt-3) capable de se lier à son ligand flt-3 retrouvé sur la membrane des cellules stromales. Cette interaction entraîne la production du récepteur à l'IL-7 (IL-7R ou CD127). Les LMPP vont commencer à exprimer RAG-1/2 et la TdT. La cellule va ensuite passer par le stade de progéniteur lymphoïde précoce dont une partie va migrer vers le thymus pour devenir des lymphocytes T, tandis que l'autre partie va rester dans la moelle osseuse pour devenir un progéniteur lymphoïde commun capable de produire des lymphocytes B, T ou NK⁴.

ii- Le stade pré-pro-B

Le premier stade de développement de la lignée B est appelé cellules pré-pro-B². Il débute avec l'expression du marqueur spécifique de la lignée B : le CD45R. Ces cellules sont également CD43³⁴. Le facteur de transcription EBF1 (pour Early B-cell Factor 1) est alors fortement exprimé⁴. A ce stade, les loci des immunoglobulines sont en configuration germinale. Il existe déjà des marqueurs de surface permettant de distinguer ces cellules (CD45R par exemple), mais elles n'expriment pas encore les éléments du BCR³³. Le niveau d'expression des enzymes RAG-1 et RAG-2 est faible. De nombreux facteurs de transcription constituent des éléments régulateurs importants à ce stade, parmi lesquels Pax-5 qui semble essentiel pour le maintien de l'engagement cellulaire vers la lignée B³³. E2A et EBF-1 vont se lier au gène *IGH*, facilitant l'accès à la région D_H-J_H, permettant la préparation à la première étape du réarrangement des gènes des immunoglobulines⁴. EBF1 est nécessaire pour l'expression de nombreuses protéines parmi lesquelles Igα et Igβ.



iii- Le stade pro-B

La cellule va ensuite exprimer de nouveaux marqueurs de surface : elle va commencer à exprimer les marqueurs CD79a (Ig α) et CD79b (Ig β), constituant le pro-BCR³³. Le complexe Ig α -Ig β est exprimé avec la protéine chaperonne Calnexine. La cellule est alors appelée cellule pro-B. Le facteur de transcription Pax-5, sous le contrôle d'EBF-1, va initier la transcription de gènes contrôles (dont le gène CD19), ce qui bloque l'expression des gènes non B et signe le passage vers le stade pro-B⁴.

La cellule va initier le réarrangement D_H-J_H, celui-ci pouvant se produire sur les 2 allèles *IGH*, puis le réarrangement V_H-D_HJ_H. Le réarrangement obtenu peut être productif ou non. Seuls les réarrangements productifs peuvent entraîner la formation d'une chaîne lourde protéique². Si le premier réarrangement V_HD_HJ_H n'est pas productif, le précurseur B peut faire une deuxième tentative avec l'autre allèle pour générer un réarrangement productif. La chaîne lourde fonctionnelle est alors produite en même temps qu'une pseudo-chaîne légère qui est composée de 2 protéines : $\lambda 5$ (ressemblant à la partie constante d'une chaîne légère) et V-preB (de structure proche de la partie variable d'une chaîne légère)^{2,8}. Les molécules de transduction du signal Ig α et Ig β (CD79a et CD79b) sont également exprimées à ce stade. Cette structure est appelée récepteur pré-B et le terme de cellule pré-B est alors utilisé. Les cellules pro-B expriment également les marqueurs CD34, CD10 et CD19, et pour la majorité d'entre elles la TdT³⁵.

iv- Le stade pré-B

Le stade pré-B est divisé en 2 : les cellules les plus immatures sont appelées grandes cellules pré-B ou pré-BI ou pré-B précoces. Les loci des chaînes légères sont en conformation germinale et les enzymes RAG-1 et RAG-2 sont faiblement exprimées³³. Les cellules les plus matures sont appelées petites cellules pré-B ou pré-BII ou pré-B ultérieur. Les enzymes RAG-1 et RAG-2 sont alors fortement exprimées et le réarrangement des chaînes légères peut avoir lieu. Le passage du stade pro-B au stade pré-B est caractérisé par la perte du CD34 et de l'expression de la TdT³⁵

Les cellules pré-BI sont sélectionnées sur l'expression du récepteur pré-BCR. Une cellule ne pouvant exprimer ce récepteur, à cause d'un réarrangement non productif, vont mourir par apoptose. On parle de contrôle pré-B⁴. Les réarrangements des gènes *IGH* sont alors stoppés afin d'éviter la formation simultanée de 2 chaînes IGH de spécificité différentes : on parle d'exclusion allélique^{2,32}. Il s'agit d'un processus par lequel un seul allèle d'un gène va être exprimé dans une cellule diploïde⁸.



Le pré-BCR va entraîner une signalisation favorisant l'exclusion allélique en réduisant l'expression de RAG-1/2, en phosphorylant RAG-2 au cours de la division cellulaire, favorisant sa dégradation et en réduisant l'accès du complexe recombinase au niveau du locus IGH⁸.

Les cellules pré-BI vont se diviser plusieurs fois, puis devenir des cellules pré-BII. A ce stade, le pré-BCR n'est plus exprimé et le réarrangement des chaînes légères débute alors, en général avec les loci IGK, puis, en cas de génération de réarrangements non productifs, une nouvelle tentative de réarrangement a lieu au niveau des loci IGL^{2,8}. Cette théorie est appuyée par le fait que les cellules B normales et malignes exprimant des chaînes légères Kappa, ont en général des loci IGL en configuration germinale, tandis que lorsque la cellule exprime une chaîne légère Lambda, les loci IGK ont généralement subi un réarrangement^{36,37}. De plus, du fait de la structure des gènes codant les chaînes légères des immunoglobulines, un nouveau réarrangement est possible sur le même allèle de chaîne légère lorsque la première tentative n'est pas productive et n'implique pas le premier segment variable (Figure 20).

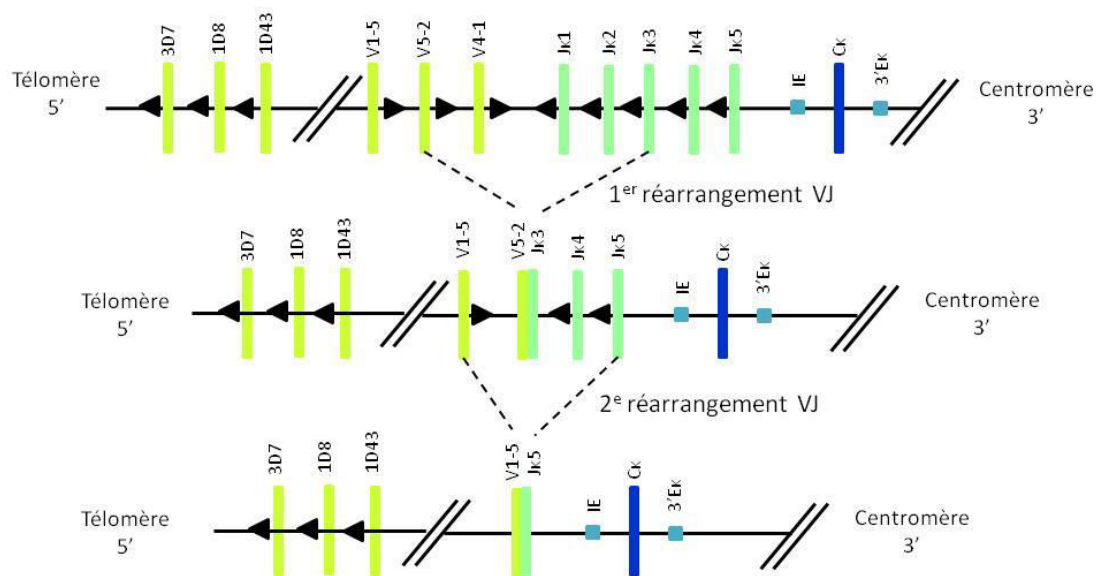


Figure 20 : Réarrangement VJ sur la chaîne légère Kappa adapté selon Le Système Immunitaire, De Boeck¹⁰. Deux recombinaisons VJ successives sur le même allèle IGK.

Le réarrangement productif de chaîne légère est alors exprimé. Si la chaîne légère produite ne peut pas s'apparier avec la chaîne lourde, alors un nouveau réarrangement débute (Figure 21). Si elle peut s'apparier, elle est alors exprimée à la surface de la cellule et on parle alors de cellule B immature. Ces cellules expriment une IgM de surface.



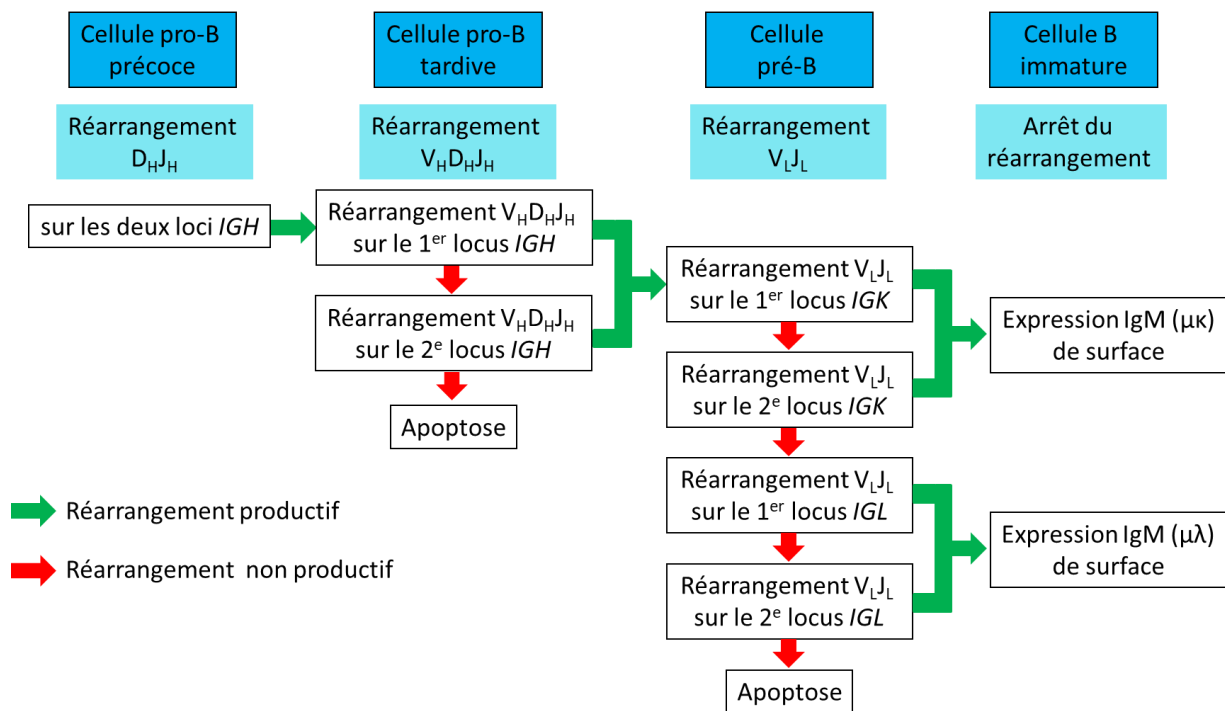


Figure 21 : Ordre de réarrangements des gènes des immunoglobulines au cours du développement lymphocytaire B précoce, adapté d'après Le système immunitaire, De Boeck¹⁰.

b- Phase dépendante de l'antigène : réponse T-dépendante

i- Les cellules B immatures

Les cellules B immatures produites par la moelle osseuse vont subir un nouveau processus de sélection afin de détecter les cellules dont le BCR reconnaît des antigènes du soi ou auto-antigènes : celles-ci vont alors soit mourir par apoptose, soit initier un nouveau réarrangement des parties variables lourdes ou légères (V(D)J) pour remplacer la chaîne initialement produite par une nouvelle^{2,38,39}. Cette modification de l'expression des chaînes variables est appelée édition du BCR (« receptor editing »). Cela permet d'éviter la génération de BCR auto-réactifs et d'améliorer la tolérance⁴⁰. Cette étape de sélection au niveau de la moelle osseuse est appelée tolérance centrale⁸. Les cellules B immatures sélectionnées par cette dernière étape deviennent des cellules B transitionnelles exprimant l'IgM de surface puis des cellules B matures qui vont quitter la moelle osseuse pour rejoindre le système immunitaire périphérique ou organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules B matures co-expriment IgM et IgD (Figure 18)¹⁰.

Certaines cellules B auto-réactives peuvent survivre à cette étape de contrôle mais vont devenir anergiques, c'est-à-dire qu'elles ne répondront pas à tout autre stimulus antigénique⁴.



Elles peuvent également devenir ignorantes, c'est-à-dire que l'antigène du soi, pour lequel la cellule B a une affinité, ne sera pas détecté soit parce qu'il est séquestré ou en concentration faible, soit parce qu'il n'est pas capable d'induire une agrégation du BCR⁸. Cependant, ces cellules ignorantes peuvent devenir réactives dans certaines conditions (inflammation, augmentation de la concentration de l'auto-antigène notamment).

ii- Les cellules B matures

Les cellules B matures produites par la moelle osseuse vont transiter via le sang pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. On parle de lymphocytes B naïfs, n'ayant rencontré que les antigènes du soi. Ces cellules vont former au niveau des organes lymphoïdes secondaires les follicules primaires, la zone du manteau ou des follicules secondaires.

Les follicules lymphoïdes primaires regroupent essentiellement des lymphocytes B, en contact avec des cellules stromales spécialisées appelées les cellules folliculaires dendritiques¹⁰. Ces dernières sont des cellules présentatrices d'antigène à l'état natif sous forme d'immun complexe. La cellule B naïve va rester transitoirement dans cette structure avant de rencontrer l'antigène. Lorsque la cellule B va rencontrer son antigène spécifique, elle va être retenue dans les zones thymo-dépendantes et être co-activée par les lymphocytes T CD4+ spécifiques du même antigène. Les lymphocytes B vont proliférer et continuer à se différencier.

Au cours de la réponse immune primaire, une partie des lymphocytes B activés va se différencier en plasmoblastes puis en plasmocytes. Ceux-ci sont spécialisés dans la production et la sécrétion d'anticorps. Les plasmoblastes sont un stade intermédiaire entre lymphocyte B activé et plasmocyte. La production d'anticorps débute alors mais la cellule continue à se diviser. Après quelques jours, la cellule peut mourir ou se différencier en plasmocytes⁸. Ces derniers vont perdre leur capacité à se diviser et leur durée de vie est de 4 semaines. A ce stade, les immunoglobulines de surface ne sont plus exprimées, entraînant une perte de la capacité de réponse face à l'antigène¹⁰. Cette première phase de différenciation plasmocytaire permet de produire rapidement des anticorps. Une partie de ces plasmocytes reste dans les organes lymphoïdes où leur durée de vie est courte, mais la majorité va migrer vers la moelle osseuse où ils vont pouvoir produire des anticorps de façon plus prolongée⁸.

Une autre partie des cellules B situées dans les follicules lymphoïdes primaires sont activées par l'antigène : on parle alors de follicules lymphoïdes secondaires avec un centre germinatif (Figure 22). Les cellules B résidentes au repos du follicule primaire sont repoussées en périphérie et forment la zone du manteau^{2,8}. Le centre germinatif va grandir avec la progression de la réponse immunitaire puis involuer lorsque l'infection est terminée (soit environ 3-4 semaines après le contact initial avec l'antigène)⁸. Les cellules B activées au niveau



du centre germinatif prennent le nom de centroblastes. Ces derniers, après avoir subi le processus d'hypermutation somatique des régions variables des gènes des immunoglobulines (obligatoire) et de commutation de classe (facultatif), mûrissent en centrocytes ayant perdu la capacité de se diviser¹⁰. Après quelques jours, deux zones différentes se dessinent au niveau histologique dans le centre germinatif : une zone sombre constituée essentiellement de centroblastes proliférants, exprimant faiblement l'immunoglobuline de surface (en particulier l'IgD) et assez peu de cellules folliculaires dendritiques, et une zone claire contenant principalement des centrocytes non proliférants, exprimant fortement l'immunoglobuline de surface, de nombreuses cellules folliculaires dendritiques et des lymphocytes Th (pour lymphocyte T helper)².

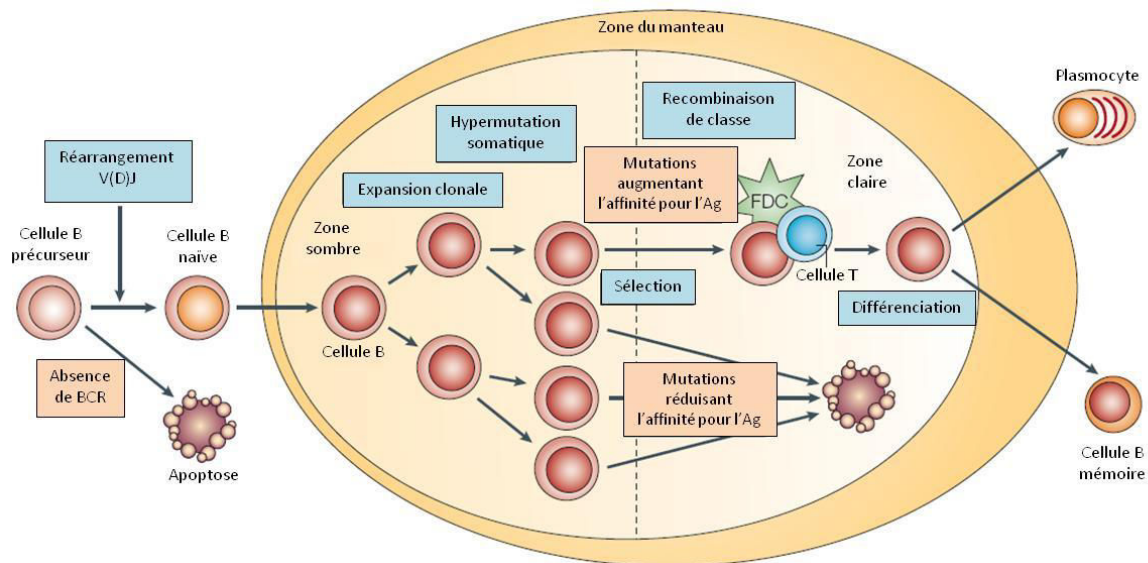


Figure 22 : Différenciation lymphocytaire B au niveau des centres germinatifs ganglionnaires, adapté d'après Küppers⁴¹. (FDC = Cellule Folliculaire Dendritique)

C'est donc au niveau du centre germinatif que les cellules B activées proliférantes vont subir le processus d'hypermutation somatique au niveau des gènes des régions variables des immunoglobulines avec une fréquence de l'ordre d'une paire de base pour 10^3 par division cellulaire (contre 1 pour 10^{10} dans les autres cellules). Ainsi chaque cellule fille va pouvoir acquérir de nouvelles mutations et il s'agit d'un processus par étape⁸.

Une sélection positive a lieu au niveau de la zone claire du centre germinatif ayant pour effet de sélectionner les cellules B exprimant un BCR de haute affinité pour l'antigène. Cette étape a lieu grâce à l'interaction avec les cellules folliculaires dendritiques qui présentent le même antigène sous forme d'immun complexe et les lymphocytes Th. De nombreuses cellules B vont acquérir des mutations défavorables et vont mourir par apoptose, puis être prises en charge par les macrophages présents dans les centres germinatifs : on parle alors de macrophages à corps tingibles à cause de la coloration des débris observés dans leur cytoplasme⁸. Les cellules B ayant acquis des mutations favorables vont alors se multiplier et pouvoir à nouveau subir



les processus d'hypermutation somatique puis de sélection. On parle de maturation d'affinité⁸. Plusieurs études ont montré que les cellules B du centre germinatif sont très mobiles et pourraient passer d'une zone à l'autre plusieurs fois^{42,43}.

Le processus de commutation de classe isotypique a lieu après activation par l'antigène et requiert la présence de cellules T et d'un certain nombre de cytokines⁸. La région constante utilisée dépend des cytokines produites par les cellules T auxiliaires et d'autres cellules immunitaires, opérant ainsi préférentiellement le switch vers un isotype d'immunoglobuline donné suivant l'environnement dans lequel se trouvent les cellules.

Les cellules B sélectionnées vont alors migrer vers d'autres zones du tissu lymphoïde secondaire ou dans la moelle osseuse. Les cellules B vont terminer leur différenciation en plasmocytes capables de sécréter des anticorps de haute affinité, issus de la commutation de classe isotypique. Les cellules B de haute affinité au niveau du centre germinatif peuvent également devenir des lymphocytes B mémoires de haute affinité. Ces cellules vont devenir quiescentes¹⁰. Elles ont une durée de vie plus longue et peuvent circuler dans l'organisme après stimulation dans les follicules lymphoïdes. Elles seront alors activées plus rapidement et pourront se différencier en plasmocytes, permettant la mise en place d'une réponse humorale plus rapide et plus puissante lors d'un contact ultérieur.

iii- Différenciation plasmocytaire

Les cellules B peuvent se différencier en plasmocytes grâce à la protéine régulatrice BLIMP-1 (pour B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1). Celle-ci va inhiber dans les cellules B du centre germinatif la transcription des gènes impliqués dans la prolifération B, dans la commutation de classe et la maturation d'affinité⁸. Les cellules B engagées dans cette voie vont arrêter de proliférer et synthétiser et sécréter fortement l'immunoglobuline.

Plus précisément, BCL-6 (pour B-Cell Lymphoma 6) est fortement exprimé par les cellules du centre germinatif et inhibe BLIMP-1. La diminution de l'expression de BCL-6 va permettre l'expression de BLIMP-1 et l'engagement vers la différenciation plasmocytaire. Le facteur de transcription MITF (pour Microphthalmia-associated Transcription Factor) inhibe également la différenciation en plasmocyte⁴⁴. L'inhibition de MITF permet l'expression de BLIMP-1 et IRF4 (pour Interferon-Regulatory Factor 4) permettant la différenciation plasmocytaire. La levée d'inhibition de BLIMP-1 va entraîner la répression du facteur de transcription PAX-5, nécessaire au maintien en stades B, ce qui permet de lever son inhibition sur XBP1 (pour X-Box binding Protein 1). BLIMP-1 et XBP1 permettent l'expression de l'immunoglobuline. IRF4 active les enhanceurs au niveau des loci des chaînes légères. OBF1 (pour Octamer-binding transcription Factor (OCT)-Binding Factor 1) active un enhanceur du locus IGH et des promoteurs au niveau d'*IGK*⁴⁴.



iv- Différenciation en lymphocyte B mémoire

Les lymphocytes B mémoire ont une durée de vie longue. Leur capacité de division est très faible voire nulle. Ils expriment une immunoglobuline de surface mais ne sécrètent pas ou peu d'anticorps⁸. Ils vont permettre une réponse rapide avec prolifération en cas de second contact avec l'antigène⁴⁴.

Il existe des lymphocytes B mémoire de type IgM qui ont une capacité de prolifération plus faible et qui sont donc moins impliqués dans les réponses secondaires à l'antigène⁴⁵. Ces cellules sont IgM⁺, CD27⁺ et ont un profil mutationnel plus faible. Il s'agirait d'une population réservoir. Ainsi, en cas de réexposition à l'antigène, ces lymphocytes B mémoire IgM⁺ pourraient ré-entrer dans le centre germinatif et subir à nouveau le processus d'hypermutation somatique et la maturation d'affinité. Il existe également des lymphocytes B mémoire switchés, c'est-à-dire exprimant une IgG, IgA ou IgE, qui seront particulièrement efficaces dans les réponses immunes secondaires, mais dont le nombre va diminuer au cours du temps⁴⁵.

c- Réponse T-indépendante

La plupart des réponses immunitaires humorales sont dépendantes des cellules T_H. Cependant, certains anticorps dirigés contre de nombreux antigènes bactériens peuvent être produits chez des sujets présentant des déficits en cellules T². Il existe deux classes d'antigènes T-indépendants (ou TI).

Les antigènes TI-1 entraînent une activation polyclonale de cellules B et peuvent être considérés comme des mitogènes des lymphocytes B. C'est le cas par exemple du Lipopolysaccharide capable de stimuler directement le BCR et par cosignal par liaison aux TLR (pour Toll-Like Receptor).

Les antigènes TI-2 sont caractérisés par des structures hautement répétitives, ce qui permet des interactions avec le BCR. Ces antigènes TI-2 sont typiquement des polysaccharides bactériens capsulaires. Il existerait des catégories spécifiques de cellules B impliquées principalement dans ces réponses T-indépendantes, à savoir les cellules B CD5⁺ et une fraction de cellules B de la zone marginale². On parle de cellules B-1. Celles-ci apparaissent de façon précoce au cours du développement. Cependant, chez le jeune enfant, la réponse aux antigènes polysaccharidiques n'est pas efficace avant l'âge de 5 ans. Les cellules B de la zone marginale apparaissent avec l'âge⁸. La réponse TI-2 est importante pour lutter contre les bactéries capsulées. En effet, la présence d'une capsule polysaccharidique permet d'échapper à la phagocytose et les cellules T ne pourront pas être activées par la présentation antigénique⁸.



B- Origine cellulaire des lymphomes B

D'une manière générale, les lymphomes sont séparés avec le lymphome de Hodgkin d'une part et les lymphomes non hodgkiniens (LNH) d'autre part. Parmi les LNH, le lignage B ou T permet de différencier les LNH-B, représentant 85 % des cas, des LNH-T². Dans ce travail, nous nous focaliserons sur les lymphomes B.

La classification OMS tend à différencier les différents types d'hémopathies selon leur contrepartie normale^{1,46}. Concernant les lymphomes B, la plupart correspondent à un stade de différenciation lymphocytaire donné (Figure 23). Cette approche est intéressante d'un point de vue physiopathologique. Cela permet d'identifier le stade cellulaire duquel dérive le clone malin et d'essayer d'élucider les mécanismes ayant entraîné la transformation de la cellule⁴¹. Ainsi, l'activation antigénique du BCR ou le microenvironnement peuvent jouer un rôle clé dans la transformation maligne. L'utilisation de techniques d'étude d'expression de gènes a permis de mettre en évidence des similitudes avec des stades de maturation donnés tels que les cellules B du centre germinatif ou les cellules B activées⁴¹. Par ailleurs, l'étude des mutations somatiques du gène de la chaîne lourde variable des immunoglobulines (*IGHV*) permet de différencier les lymphomes en 2 grands groupes, la présence de mutations somatiques étant un marqueur de transit dans le centre germinatif². Ainsi, un premier groupe correspond aux cas de lymphomes ne présentant pas d'hypermutation somatique du locus *IGHV* : c'est le cas des lymphomes pré-GC tels que la plupart des cas de lymphomes du manteau. Ce groupe comprend également les cas de lymphomes n'ayant pas ou peu subi l'hypermutation somatique au cours du passage dans le centre germinatif, ce qui est observé dans la leucémie lymphoïde chronique et le lymphome lymphocytaire². Le deuxième groupe comprend les cas de lymphomes pour lesquels une hypermutation du locus *IGHV* est mise en évidence. Dans ce cas, les lymphomes sont supposés dériver de lymphocytes au stade GC ou post-GC. Parmi ceux-ci, on retrouve notamment le lymphome de Burkitt, le lymphome folliculaire, ou le lymphome lymphoplasmocytaire².



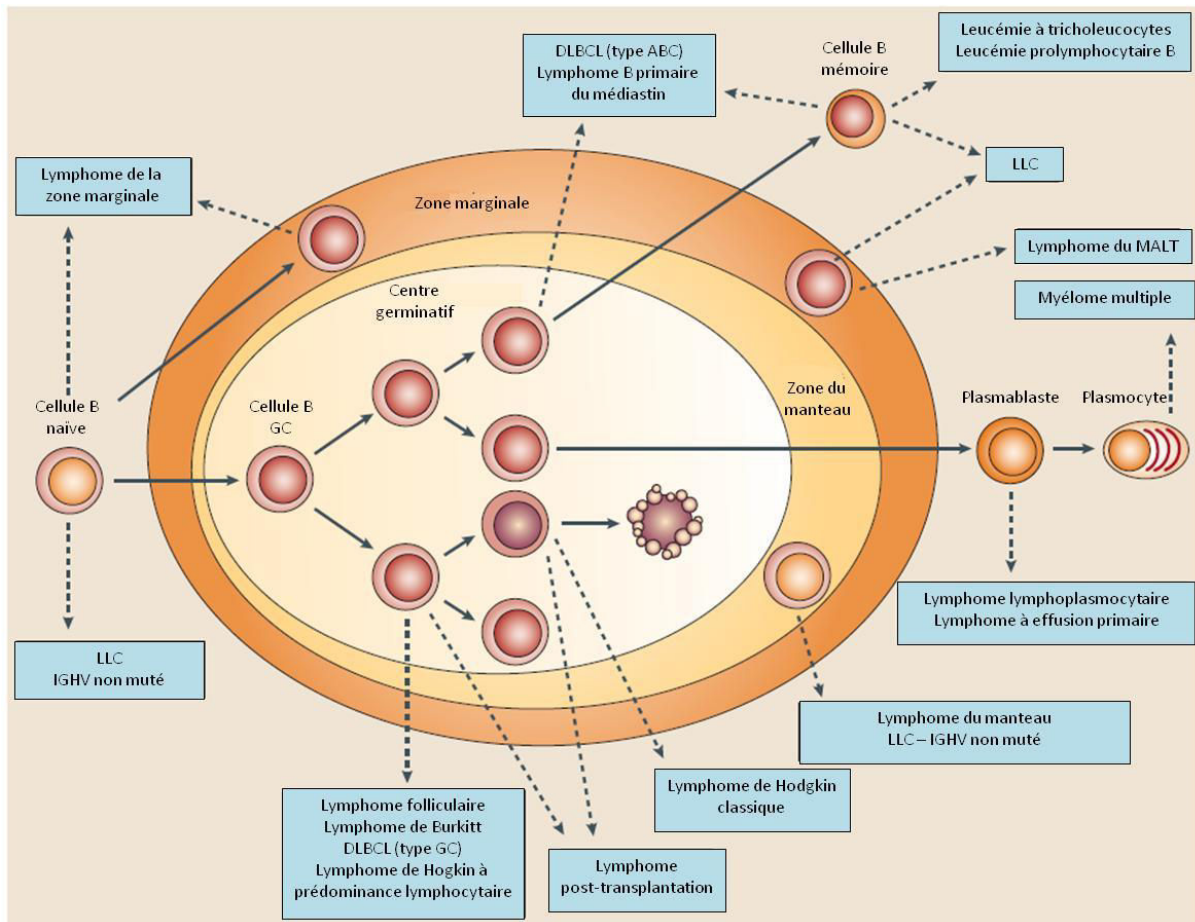


Figure 23 : Origine cellulaire des lymphomes B adapté d'après Küppers⁴¹.

Les flèches pleines indiquent la maturation lymphocytaire B normale. Les flèches en pointillés montrent les lymphomes B correspondant à un stade de maturation lymphocytaire donné. ABC = Activated B-Cell. DLBCL = Lymphome B diffus à grandes cellules. GC = centre germinatif. IGHV = gène variable de la chaîne lourde des immunoglobulines. LLC = Leucémie Lymphoïde Chronique. MALT = Mucosa Associated Lymphoid Tissue.

C- Voies d'oncogénèse dans les lymphomes B

Comme dans la plupart des cancers, la pathogénèse des lymphomes B est un processus multi-étapes impliquant l'accumulation de lésions génétiques affectant des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur². Cependant, le génome des lymphomes serait relativement stable selon les études cytogénétiques, comparé à celui de la plupart des tumeurs solides, et est caractérisé par quelques anomalies cytogénétiques récurrentes, en particulier les translocations chromosomiques².



On distingue les événements oncogéniques primaires tels que la translocation *IGH-BCL2* dans le lymphome folliculaire supposé survenir au cours du réarrangement VDJ dans la moelle osseuse. D'autres événements oncogéniques sont dits secondaires et apparaissent plus tardivement. C'est le cas par exemple des mutations de *TP53*.

Au niveau moléculaire, parmi les événements oncogéniques identifiés dans la pathogénèse des lymphomes B, on note l'activation d'oncogènes, soit par mutations introduites notamment lors du processus d'hypermutation somatique, soit par translocations réciproques, dont certaines sont caractéristiques d'un type de lymphome, ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs par délétion chromosomique ou mutation². De plus, la lymphomagenèse peut comprendre l'introduction de gènes exogènes sous l'action de virus oncogéniques. Les translocations chromosomiques réciproques impliquent fréquemment les gènes des immunoglobulines (*IGH*, *IGK* ou *IGL*) et un proto-oncogène. Ce mécanisme permet de déréguler l'expression de l'oncogène qui est alors sous le contrôle d'éléments activateurs des gènes des immunoglobulines⁴¹.

1- Dérégulation oncogénique via translocation

Les translocations chromosomiques réciproques sont un mécanisme de dérégulation oncogénique bien connu dans les lymphomes B et constituent un événement primaire dans la lymphomagenèse⁴¹. Il s'agit généralement de translocations équilibrées, impliquant 2 chromosomes spécifiques, associés de façon récurrente dans certains types de lymphomes.

Il a été démontré que le processus de translocation est la conséquence d'erreurs se produisant soit sous l'action des enzymes RAG au cours du réarrangement VDJ, soit via AID lors de la recombinaison de classe au niveau d'*IGH* ou du processus d'hypermutation somatique des régions variables des gènes des immunoglobulines². En effet, ces processus génèrent des cassures double-brin de l'ADN, pouvant entraîner la formation de recombinaisons illégitimes à l'origine de ces translocations². Le processus de NHEJ permet la formation des jonctions dans ce type de translocation⁴⁷. Ceci entraîne la perte de quelques nucléotides, l'alignement de microhomologie terminale (de 0 à 3 pb) et l'insertion de nucléotides soit par la TdT, soit par les ADN polymérase μ ou λ .

Ces translocations impliquent typiquement un des loci des immunoglobulines et un proto-oncogène dont l'expression va alors être dérégulée lors de son rapprochement avec des éléments régulateurs du locus des immunoglobulines (Figure 24). Certaines translocations sont même une caractéristique de certains lymphomes. Par exemple, la translocation entre un locus d'immunoglobuline et le gène *MYC* dans le lymphome de Burkitt permet d'activer l'oncogène *MYC*. Il s'agit d'une caractéristique de ce type de lymphome, bien que non spécifique. De même, la translocation entre un locus d'immunoglobuline et le gène *CCND1* (pour Cycline D1) est une caractéristique du lymphome du manteau. Enfin, la translocation avec le gène *BCL2* (pour B-Cell Lymphoma 2) est retrouvée dans le lymphome folliculaire



notamment. Ce type de translocation peut être retrouvé à une faible fréquence dans les cellules B de sujets sains^{48,49,50}. Ceci suggère un processus de lymphomagénèse multi-étapes.

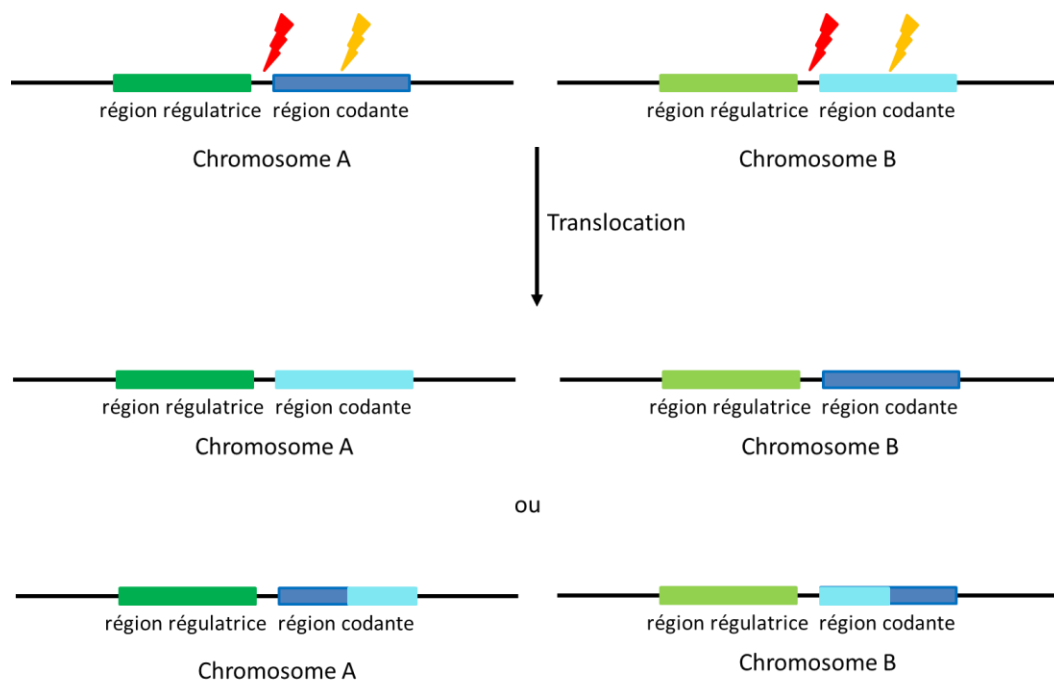


Figure 24 : Mécanismes de dérégulation génique via translocation dans les lymphomes B, adapté d'après Armitage *et al.*².

Les 2 grands mécanismes de dérégulation génique via translocation sont représentés. Dans le 1^{er} cas, la région régulatrice d'un gène situé sur le chromosome A va être rapprochée de la région codante du gène initialement présent sur le chromosome B, entraînant une dérégulation de l'expression de ce gène. Dans le 2^{ème} cas, la cassure a lieu au niveau de la région codante du gène et génère un gène de fusion, générant une protéine de fusion dont les propriétés biochimiques sont différentes de celles de la protéine native.

Un autre mécanisme de dérégulation via translocation consiste en la fusion des régions codantes de 2 gènes (Figure 24). Dans ce cas, une protéine chimérique est produite. Ce mécanisme est commun dans les leucémies aiguës et plus rare dans les lymphomes. Il est notamment retrouvé dans les lymphomes du MALT².



a- Translocations impliquant le gène des immunoglobulines

i- Points de cassure au niveau des gènes des immunoglobulines

Trois principaux types de cassures au niveau des gènes des immunoglobulines sont décrits.

Le premier point de cassure se situe au niveau des régions J ou D-J. Ce type de réarrangement entraîne fréquemment la perte ou l'addition de quelques nucléotides au niveau des extrémités D et J, ce qui suggère que ce type de translocations est dû à des erreurs au cours du mécanisme de recombinaison VDJ au niveau des stades précoces de la lymphopoïèse dans la moelle osseuse⁴¹. Ce cas est fréquemment retrouvé dans les translocations *IGH-BCL2* du lymphome folliculaire⁴¹.

Un autre type de translocations entraîne des points de cassure proches des segments VDJ réarrangés. Dans ce cas, les gènes des régions V présentent toujours des mutations somatiques⁴¹. Ces translocations pourraient donc se produire au moment du processus d'hypermutation somatique au cours duquel se produisent des cassures d'ADN.

Le troisième type de translocation entraîne des points de cassure au niveau des régions Switch des parties constantes des immunoglobulines. Des cassures de l'ADN se produisent physiologiquement à ce niveau au cours de la commutation de classe isotypique et ce type de translocation est donc supposé correspondre à une erreur au cours de ce processus⁴¹.

ii- Points de cassure au niveau du gène partenaire

Si les points de cassure au niveau des gènes des immunoglobulines, en particulier au niveau du locus *IGH*, sont bien décrits, l'origine de la cassure d'ADN au niveau de l'oncogène est en revanche moins claire. Il a été proposé que les régions concernées au niveau du gène partenaire pourraient contenir des séquences proches des RSS ou une structure similaire à un intermédiaire de recombinaison⁵¹.

Pour la translocation *IGH-BCL2*, la principale région de cassure au niveau de *BCL2* est confinée dans une région de 150 pb appelée la région majeure de cassure ou Mbr (pour Major breakpoint region)⁵². Il a été montré que le complexe RAG est capable d'aller provoquer des cassures au niveau de cette région y compris lorsqu'il n'y a pas de RSS. Ceci serait dû à la structure de cette région capable d'entraîner une stabilité à l'état simple brin⁵². Ainsi, le complexe RAG pourrait interagir à ce niveau et induire la recombinaison aberrante entre le locus VDJ et le Mbr, ce qui aboutirait à cette translocation. De plus, le complexe RAG possède



une activité de transposase^{53,54}. Un mécanisme de transposition pourrait expliquer de telles translocations ou entraîner l'insertion du fragment excisé au cours du processus VDJ.

Certains des gènes impliqués dans ces translocations impliquant les gènes des immunoglobulines subissent également le phénomène d'hypermutation somatique de façon aberrante, ce qui pourrait générer des cassures d'ADN⁴¹. C'est le cas par exemple pour le gène *BCL6* impliqué dans des translocations avec les loci des immunoglobulines⁴¹.

iii- Mécanismes et conséquences des translocations impliquant les gènes des immunoglobulines

Translocations résultant du processus de recombinaison V(D)J

De nombreuses translocations dans les lymphomes B présentent des caractéristiques structurales suggérant un rôle du processus de recombinaison V(D)J⁴⁸. Les deux exemples les plus typiques sont les translocations *IGH-BCL2* et *IGH-CCND1*. L'étude des points de cassure de ces dernières montre certaines particularités. En effet, pour les translocations *IGH-CCND1*, l'usage des JH est comparable aux cellules B normales, alors que dans les cas *IGH-BCL2* du lymphome folliculaire, les segments JH les plus en aval et les segments DH les plus en 5' sont préférentiellement impliqués^{48,55,56}. Les points de cassure de la translocation *MYC-IGH* du lymphome de Burkitt endémique sont également situés au niveau des régions JH et seraient liés à l'activité de RAG au cours de la recombinaison VDJ⁵⁷.

Ce type de translocation nécessiterait 3 cassures double brin : au niveau des segments DH et JH d'une part, et au niveau de l'oncogène d'autre part. Du fait de la perte de la portion entre les segments DH et JH impliqués, ce type de translocation n'est pas complètement équilibré⁴⁸.

Dans le cas de la translocation *IGH-BCL2*, les points de cassure sont proches de sites RSS au niveau de segments JH ou à l'extrémité 5' du RSS de segments D_HJ_H, ce qui implique que ce type de translocation se produit au moment où la cellule réalise le réarrangement DJ ou VDJ⁴⁸. Cette hypothèse est renforcée par le fait que des nucléotides ressemblant aux N-nucléotides sont ajoutés au niveau des points de cassure. Le fragment germinal entre le DH et le JH réarrangés étant délété, ces translocations ont probablement lieu au moment du processus de recombinaison D_HJ_H, au moment où les cassures double brin sont générées. De plus, le fait que le segment DH ait une séquence germinale est un argument supplémentaire, et en défaveur de l'hypothèse d'une translocation survenant sur un allèle ayant déjà opéré le réarrangement VDJ.

En parallèle, il avait été initialement proposé que les points de cassure au niveau de l'oncogène partenaire étaient liés au mécanisme de recombinaison V(D)J. Cependant, l'origine



de ce mécanisme est mal connu. En effet, des motifs ressemblant à des RSS ne sont généralement pas clairement identifiés au niveau des points de cassure, et le mécanisme ne serait alors pas guidé par ce type de séquence⁴⁸. Par ailleurs, des duplications de nucléotides sont fréquemment observées au niveau des points de cassure dans les gènes *BCL2* et *CCND1*. Ceci suggère des cassures de l'ADN décalées, ce qui n'est pas compatible avec un processus médié par RAG. De plus, au niveau des points de jonction *IGH-BCL2* et *IGH-CCND1* est observée l'insertion de nucléotides appelés les T-nucléotides (pour templated nucleotides)^{48,56}. Il s'agit de courtes copies de séquences JH, DH ou Mbr, pouvant être insérées directement ou inversées. Ces T-nucléotides ne sont généralement pas juste au niveau du point de cassure et présentent des mutations. Ceci suggère l'intervention d'un mécanisme de réparation de courtes séquences générant des erreurs^{48,55}.

Dans certaines translocations impliquant *IGH*, en particulier dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T, il est rapporté des séquences appelées pseudo-signaux ou RSS cryptiques ou sites de mé-reconnaissance, qui correspondent à des régions de séquence proche de celle des RSS et qui fonctionnent de la même façon⁵¹. Des erreurs de recombinaison VDJ par les enzymes RAG peuvent également entraîner des délétions et des transpositions au niveau de gènes autres que les gènes des immunoglobulines ou du TCR⁴⁸. La séquence adjacente au point de cassure possède alors les caractéristiques heptamère/nonamère et le site de translocation est situé immédiatement en 5' d'un CAC (la séquence critique d'un heptamère)⁵¹. Cependant, ce type de séquence n'est généralement pas retrouvé au niveau du gène partenaire impliqué dans les translocations avec un gène des immunoglobulines.⁴⁷

Dans le cas des cassures au niveau de *BCL2*, un modèle basé sur la présence de séquences « Chi-like »^a au niveau des deux principales régions de cassures dans *BCL2* a été proposé^{48,58}. En effet, les translocations dans différents oncogènes se produisent à proximité d'une séquence consensus de 8 pb de type CC[A/T]CC[A/T]GC⁵⁸. En faveur de ce modèle, il a été démontré qu'une endonucléase clive spécifiquement au niveau du Mbr dans *BCL2* dans les cellules du lignage B^{48,56}. Une protéine de 45 kD (bp45) se lie à un motif Chi-like au niveau du Mbr (GGGAGGACGGGAGGAAGGCG). L'hypothèse est que cette protéine bp45 se lierait aux séquences Chi-like et servirait de molécule accessoire pour les nucléases endogènes. De plus, il existe des séquences Chi-like au niveau des segments JH et DH : la protéine bp45 pourrait jouer un rôle dans le rapprochement entre *IGH* et le gène partenaire et donc favoriser le mécanisme de translocation^{48,59}.

Il a également été démontré que RAG peut jouer un rôle de transposase, c'est-à-dire qu'il s'agit d'une enzyme capable de couper un fragment d'ADN au niveau de séquences de reconnaissance spécifiques et d'intégrer ce fragment au niveau d'une autre molécule d'ADN^{48,54,60}. Cette fonction des enzymes RAG permet d'intégrer les fragments d'ADN entourés de séquences RSS issus de la recombinaison VDJ au niveau d'une autre région d'ADN,

^a Les séquences Chi correspondent à une séquence de 8 nucléotides (octamère : CCACCAGC), décrite initialement chez *Escherichia coli*. Il s'agit de régions activatrices de recombinaison.



et potentiellement au niveau d'un oncogène. Dans ce cas, il s'agit d'une réaction de transesterification avec duplication de quelques paires de bases au niveau de l'insertion⁴⁸. Pour ce mécanisme, deux modèles sont proposés⁵⁴. Dans un premier modèle, la cassure en JH ou DH crée des extrémités franches capables de s'intégrer au niveau d'un autre fragment d'ADN. La structure branchée obtenue est alors à nouveau modifiée pour aboutir à une structure en épingle à cheveu et une jonction interchromosomique contenant le RSS⁵³. La translocation réciproque se produit lorsque les deux structures en épingle sont jointes (une au niveau du segment JH ou DH et une au niveau de l'autre chromosome) (Figure 25).

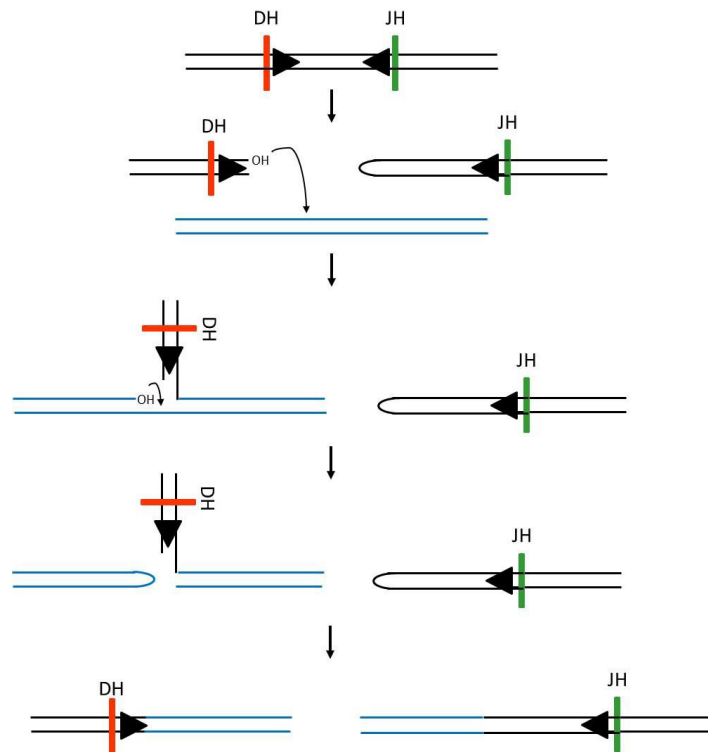


Figure 25 : Modèle de translocation via transposition médiée par RAG, faisant intervenir des extrémités franches, adapté d'après Roth et Craig⁵³.

Génération d'extrémités franches en VDJ (exemple en DH ici). La structure est alors capable de s'insérer sur un ADN cible (en bleu) pour générer une structure branchée. RAG coupe cette structure branchée et entraîne la formation de structures en épingles à cheveu, aboutissant à une translocation contenant alors le RSS au niveau de la jonction.

Dans ce cas, le RSS en 5' est retrouvé au niveau du site de translocation. Le deuxième modèle propose une insertion : les deux RSS génèrent des extrémités franches et permettent la transposition du fragment d'ADN excisé. Dans ce modèle, il est aussi possible d'obtenir une translocation lorsque la structure obtenue n'est pas insérée, via la formation d'une structure en épingle (Figure 26). Dans ce cas, un segment DH ou JH est retrouvé au niveau du site de translocation avec une large délétion du chromosome 14 lors du processus. La plupart des translocations *IGH-BCL2* et *IGH-CCND1* étudiées correspondent au second modèle⁴⁸.



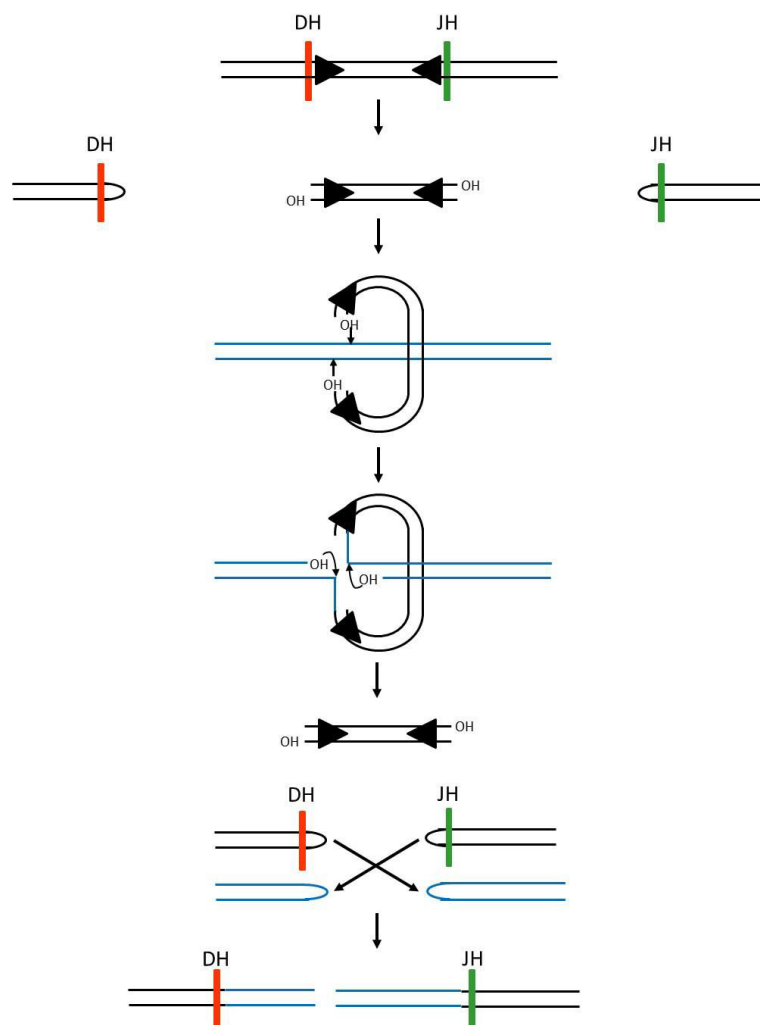


Figure 26 : Modèle de translocation par transposition via insertion médiée par RAG, adapté d'après Küppers et Dalla-Favera⁴⁸.

Le fragment excisé au cours de la recombinaison D_H - J_H est transposé au niveau d'un autre fragment d'ADN (traits bleus) et génère une structure branchée. RAG va à nouveau modifier cette structure, entraînant des cassures double brin au niveau de l'ADN cible, et des extrémités en épingle à cheveu. Enfin, le fragment d'ADN cible et les segments D_H et J_H sont joints, donnant lieu à une translocation.

En l'absence de RSS cryptique retrouvé, il a été proposé un rôle de la structure de l'ADN au niveau des points de cassure sur le gène partenaire⁵¹. Ainsi RAG2 pourrait être recrutée indirectement au niveau de régions chromatiniennes riches en histone 3 lysine 4 triméthylée (H3K4me3), RAG1 pourrait se lier directement aux histones, ou le complexe RAG pourrait interagir avec l'ADN de façon non spécifique⁶¹.



Un mécanisme mixte faisant intervenir une cassure double brin liée à la recombinaison V(D)J médiée par RAG au niveau du gène des immunoglobulines et une autre origine au niveau du gène partenaire est également possible⁴⁷. Une intervention d'AID au niveau du gène partenaire est susceptible d'être en cause. La co-expression de RAG et d'AID est possible à certains stades du développement. Au stade pro-pré-B, l'enzyme RAG est exprimée pour la génération de la recombinaison V(D)J et AID est également exprimée à un faible niveau comparé à celui des cellules du GC, mais ce serait suffisant pour la génération de translocations⁴⁷.

Enfin, la cassure au niveau de l'oncogène peut également être non spécifique et causée par des facteurs tels que les radiations ionisantes, des dommages causés par des radicaux libres oxygénés ou des réactions des topoisomérases II avortées⁴⁷.

La conséquence des translocations avec points de cassure au niveau des régions JH est une dérégulation liée à la présence de l'enhancer E_{μ} . La dérégulation a donc lieu au niveau du dérivé 14 (Figure 27).

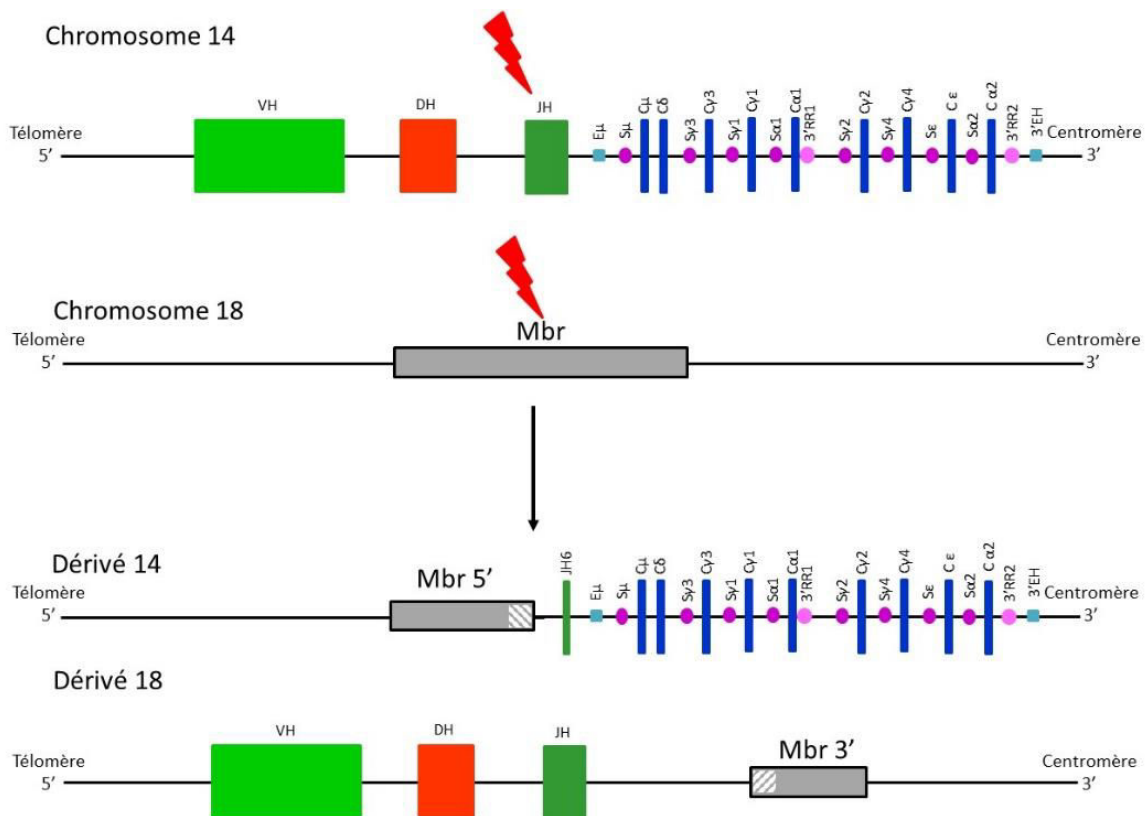


Figure 27 : Mécanisme de la translocation *IGH/BCL2* au cours du processus de recombinaison VDJ (exemple de cassure dans les régions JH pour *IGH* et au niveau de la *Mbr* pour *BCL2*). Les points de cassures sont représentés par les éclairs rouges au niveau des chromosomes 14 et 18.



Translocations résultant du processus de recombinaison de classe

De nombreuses translocations comprennent des points de cassure au niveau des régions switch d'*IGH*. C'est le cas par exemple pour la t(8;14) avec *MYC* dans le lymphome de Burkitt sporadique, la t(14;19) avec *BCL3* dans la leucémie lymphoïde chronique et la t(3;14) avec *BCL6* dans le DLBCL⁴⁸.

Du fait de la présence de points de cassure au niveau des régions Switch, ce type de translocation se produit probablement lors du processus de recombinaison de classe, au moment de la génération de cassure double brin de l'ADN. Généralement, les oncogènes impliqués sont alors situés sur le dérivé 14 et juxtaposés aux régions régulatrices 3'RR situées au niveau des parties constantes d'*IGH*, entraînant leur dérégulation (Figure 28)⁴⁸.

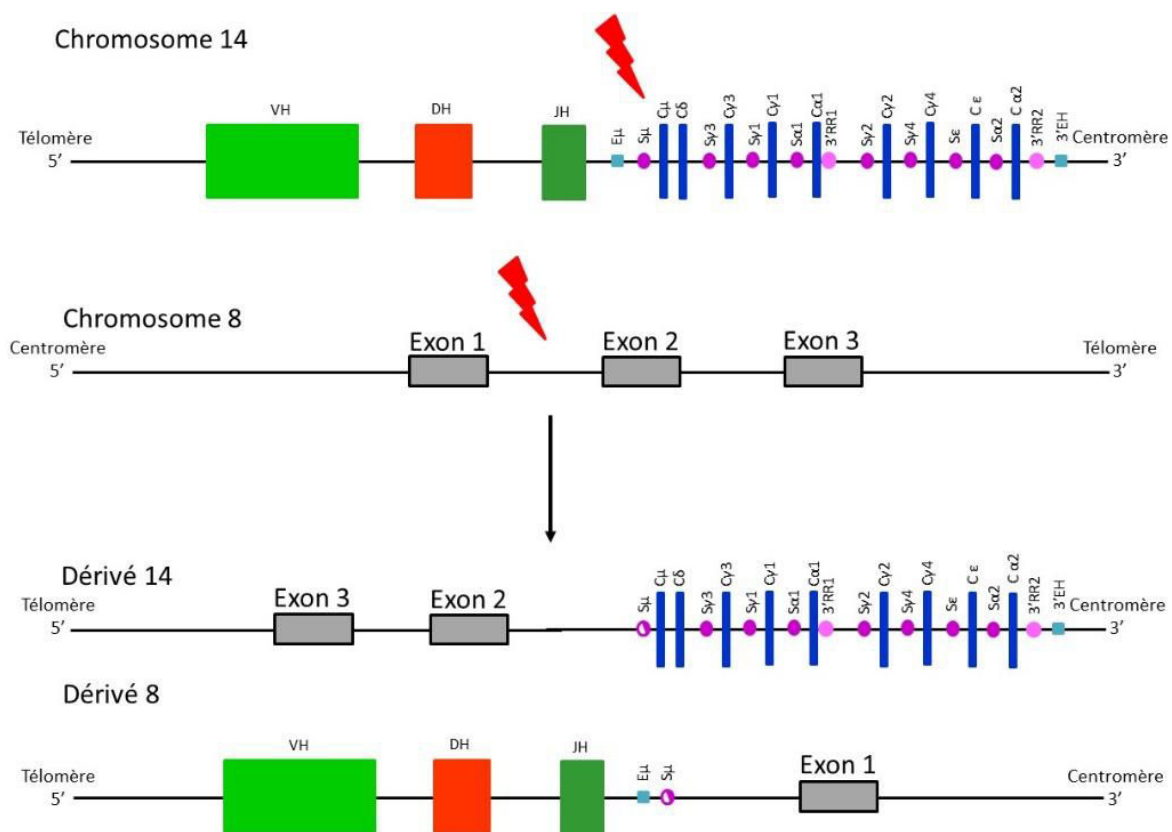


Figure 28 : Mécanisme de la translocation *IGH-MYC* faisant intervenir la recombinaison de classe, adapté d'après Blum *et al.*⁵⁷

Exemple de cassure au niveau de la région Sμ. Les points de cassures sont représentés par les éclairs rouges au niveau des chromosomes 14 et 8.



Cependant, ce type de translocation entraîne en parallèle la délocalisation du segment JH-intron $C\mu$ au niveau de partenaire de translocation et cela peut également entraîner une dérégulation de gènes au niveau de l'autre chromosome dérivé⁴⁸. C'est le cas par exemple pour la t(4;14) dans le myélome multiple⁶².

Bien que la recombinaison de classe entraîne deux cassures double-brin, ce type de translocation fait généralement intervenir une seule région switch. C'est le cas pour les translocations faisant intervenir $S\mu$. C'est également le cas pour de nombreuses translocations faisant intervenir $S\gamma$ ou $S\alpha$. Cela suggère qu'une structure dans le complexe de recombinaison pourrait favoriser l'interaction d'une seule région switch avec le chromosome partenaire au cours de la translocation⁴⁸.

De plus, il a été montré que les lymphocytes B sains peuvent effectuer une recombinaison entraînant une délétion de morceaux de régions $S\mu$ ⁴⁸. Il s'agirait d'un événement de stabilisation de l'isotype permettant de prévenir la recombinaison de classe. Ainsi, les translocations impliquant $S\mu$ au niveau des deux dérivés d'une translocation pourraient résulter de ce type d'événement et non d'une véritable recombinaison de classe.

La recombinaison de classe est également susceptible d'entraîner la dérégulation de gènes via des événements d'insertion⁴⁸. Ceci a été décrit dans un cas de myélome dans lequel une séquence délétée au cours de la recombinaison de classe a été insérée à proximité du gène *CCND1*. Comme ce fragment d'ADN contient l'enhancer $\alpha 1$, cette insertion entraîne la surexpression de la cycline D1⁶³.

La génération de translocations au cours du processus de recombinaison de classe pourrait être favorisée par la formation de boucles R (« R-loop »)^a ou par la présence de promoteurs entraînant des transcriptions divergentes ou convergentes, ceci favorisant la formation d'ADN simple brin⁴⁷. En effet, il a été démontré que les régions hautement actives sur le plan transcriptionnel sont des cibles d'AID dans des modèles murins^{64,65}.

Cependant, le mécanisme d'hypermutation somatique est également susceptible d'intervenir dans la génération de translocation impliquant les régions switch, par cassure au niveau du gène partenaire⁴⁸.

^a Boucle R ou « R-loop » : Séquences riches en G sur le brin non transcrit, générant un ARN riche en G pouvant s'hybrider sur le brin transcrit, tandis que l'ARN polymérase continue la transcription⁴⁷. Cela génère donc des hybrides ADN-ARN et une structure à 3 brins.



Rôle du processus d'hypermutation somatique dans les translocations et la lymphomagénèse

Le processus d'hypermutation somatique entraîne la modification de nucléotides, mais également des délétions et duplications, faisant ainsi intervenir des cassures double brin de l'ADN⁴⁸. Ceci a été prouvé au niveau des régions variables dans les cellules B^{12,66}. L'étude des points de cassure dans certaines translocations est en faveur de ce mécanisme. Dans le cas du lymphome de Burkitt, les points de cassures des translocations se situent fréquemment au niveau des régions variables réarrangées ou des introns des régions J en aval, soit les régions ciblées par l'hypermutation somatique⁴⁸. De plus, dans ces cas, des mutations somatiques ont été identifiées au niveau des régions variables réarrangées. Un autre élément important est l'absence de signal RSS identifiable à proximité des points de cassure. Dans ces cas, des motifs type CpG ou WGCW (ou W est un A ou un T) peuvent être retrouvés⁴⁷. Enfin, des mutations somatiques sont présentes en 5' des régions variables, alors que ces segments sont séparés de l'enhancer au cours de la translocation. La proximité de l'enhancer étant nécessaire pour l'hypermutation somatique, cela suggère que la translocation se produit donc après l'hypermutation du segment variable réarrangé⁴⁸.

Le processus d'hypermutation somatique touche d'autres gènes impliqués dans les translocations, tels que *BCL6*, impliqué dans les translocations *IGH/BCL6* dans les DLBCL.

Ce type de translocation entraîne le rapprochement de l'oncogène avec l'enhancer E μ sur le dérivé 14, entraînant sa dérégulation.

Autres mécanismes de translocation

Dans certains cas, aucun des 3 processus précédents ne semble compatible avec les points de cassure retrouvés. En particulier, cela concerne les translocations impliquant les gènes des chaînes légères des immunoglobulines dans lesquels les points de cassure se situent 2 à 5 kb en amont des segments J non réarrangés d'*IGK* ou *IGL*. Ceci a été décrit par exemple dans le lymphome de Burkitt⁶⁷. Dans ces cas, aucune séquence mimant un RSS ou un switch n'est retrouvé et de tels segments non réarrangés ne sont pas touchés par l'hypermutation somatique⁴⁸. Il est possible que la structure ouverte des gènes des immunoglobulines dans les cellules B puisse entraîner une augmentation du risque de cassure de l'ADN, indépendamment des processus de recombinaison et d'hypermutation somatique⁴⁸.

Les gènes des immunoglobulines sont aussi impliqués dans des translocation complexes impliquant parfois 3 partenaires. Ceci démontre l'instabilité génétique des loci des immunoglobulines dans les cellules B, et la variété des réarrangements aberrants pouvant être observés.



b- Translocations n'impliquant pas les gènes des immunoglobulines

Bien que la majorité des translocations observées dans les lymphomes B implique les gènes des immunoglobulines, il existe également des translocations impliquant d'autres gènes et pouvant entraîner des transcrits de fusion. Un exemple bien décrit est celui du lymphome du MALT dans lequel la $t(11;18)(q21;q21)$ est retrouvée dans environ 50 % des cas². Cette translocation implique les gènes *BIRC3* (pour baculoviral IAP repeat containing 3, anciennement *API2* pour Apoptosis Inhibitor 2, IAP signifiant Inhibitor of Apoptosis Protein) en 11q21 et *MALT1* (pour Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1) en 18q21. *BIRC3* appartient à la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose, tandis que *MALT1* induit la voie NFκB. Cette translocation entraîne la formation d'un transcrit de fusion, entraînant une activation du complexe NFκB, avec des effets anti-apoptotiques pouvant contribuer à la pathogénèse du lymphome du MALT².

Un autre exemple est celui du DLBCL dans lequel le gène *BCL6* (situé en 3q27) est fréquemment impliqué dans des translocations avec différents partenaires tels que *PIM1* (pour Pim proto-oncogene) en 6p21 ou *CIITA* (pour class II major histocompatibility complex transactivator) en 16p13^{2,68-70}. La protéine *BCL6* agit comme un potentiel répresseur transcriptionnel de séquences promotrices. Son expression est restreinte dans les cellules B au stade GC. Ces translocations entraînent la formation d'un transcrit de fusion dans lequel le promoteur et le premier exon non codant de *BCL6* sont remplacés par des séquences dérivées du gène partenaire. Le point commun entre ces promoteurs est un spectre plus large d'activité au cours du développement B par rapport au gène *BCL6* sauvage, en particulier dans les stades post-GC incluant les plasmocytes et immunoblastes². La translocation a pour effet de lever la sous-régulation normale de l'expression de *BCL6* associée à la différenciation en cellules post-GC.

Un dernier exemple est celui des gènes *PDL1* et *PDL2* (pour Programmed Death Ligand 1 et 2, situés en 9p24.1), fréquemment transloqués dans les lymphomes B primaires du médiastin⁷¹. Cela entraîne une augmentation de l'expression des *PDL1* ou *2* soit via l'échange de promoteurs hautement exprimés dans les cellules B, soit via la juxtaposition d'éléments enhancer de la même façon que pour les translocations impliquant les gènes des immunoglobulines⁷². Il a été montré que l'expression des *PDL1* et *2* modifie la réponse anti-tumorale dans plusieurs types de cancers⁷³. Certaines translocations entraîneraient un phénotype avantageux sur le plan immunologique dans un contexte d'activation des cellules T⁷². De plus, ces translocations pourraient également avoir comme deuxième effet d'annuler l'expression du gène partenaire ayant une fonction suppressive de tumeur. Enfin, certaines translocations pourraient entraîner la perte du site de liaison de micro-ARN, allonger la demi-vie du transcrit, et augmenter l'efficacité traductionnelle par la modification de la structure secondaire de l'ARN messenger⁷².



2- Mutations géniques

Le processus d'hypermutation somatique génère via AID des mutations au niveau des parties variables des immunoglobulines, mais peut aussi entraîner des mutations dans d'autres gènes tels que *BCL6* ou *CD95* (ou *FAS*)^{13,14,15}. Dans de rares cas, ces mutations peuvent contribuer à l'apparition de lymphomes. Par exemple, des mutations inactivatrices de *CD95* sont retrouvées dans environ 20 % des lymphomes B post-centre germinatif. *CD95* (ou *FAS*) est une protéine transmembranaire dont l'interaction avec son ligand va entraîner la mort cellulaire par apoptose. Son inactivation par mutation peut protéger la cellule contre cette voie d'apoptose⁴¹.

Une hypermutation somatique aberrante de *BCL6* et d'autres proto-oncogènes tels que *MYC* ou *PAX5* a été mise en évidence dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL)⁷⁴. Dans le cas de *MYC* par exemple, les mutations peuvent toucher aussi bien les régions non traduites que les régions codantes, entraînant des changements d'acides aminés, ayant de potentielles conséquences fonctionnelles².

Il peut également se produire des mutations ponctuelles indépendamment du processus d'hypermutation somatique². Ces mutations sont reconnues comme étant des événements transformants et peuvent toucher des gènes suppresseurs de tumeurs (mutations inactivatrices de *TP53* ou du gène codant pour IκBα (pour nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell inhibitor alpha)) ou des proto-oncogènes (mutations ponctuelles activatrices de *RAS*). Il a également été démontré que la voie NFκB peut être altérée dans les DLBCL via des mutations ponctuelles au niveau de gènes régulateurs positifs (*CARD11* par exemple) ou négatifs (*TNFAIP3* par exemple) du complexe NFκB, entraînant une activation constitutive de ses fonctions anti-apoptotiques et prolifératives^{2,75}.

Avec le développement du NGS, de nombreuses mutations ont pu être mises en évidence dans les lymphomes⁷⁶. Quatre grands types de mutations peuvent être distingués sur le plan fonctionnel :

- Modifications de la prolifération et de l'apoptose, parmi lesquelles des mutations gain de fonction ou perte de fonction, entraînant une dérégulation des voies de signalisation NFκB et/ou JAK-STAT. On note parmi celles-ci les mutations des gènes *CARD11*, *TNFAIP3*, *MYD88*, *CD79A/CD79B*, *PRDM1*, *STAT6* et *JAK2*.

- Modifications de la différenciation, comprenant également des mutations gain de fonction ou perte de fonction. Ce type de mutation entraîne un arrêt de différenciation à un stade spécifique ou entraîne une différenciation vers un lignage donné. Les gènes affectés codent des facteurs de transcription, parmi lesquels : *BCL6*, *NOTCH1*, *FOXO1*, *PAX5*, *IRF4*, *BTG1*, *ETS1* et *MEF2B*.

- Modifications épigénétiques. Ce type de mutation inclut des facteurs impliqués dans l'ajout ou la suppression de modifications post-traductionnelles au niveau de l'ADN et des



histones. Les gènes touchés sont par exemple *MLL2*, *EZH2*, *KDM2*, *EP300*, *CREBBP*, *JMJD2C*, *TET2* et *DNMT3A*. Ce type de mutation touche également les gènes impliqués dans l'épissage des ARN et l'export nucléaire. Par exemple, des mutations inactivatrices des acétyltransférases *EP300* et *CREBBP* empêchent l'activation via acétylation de *TP53*, contribuant à la lymphomagénèse⁷⁷.

- Modifications du microenvironnement et de la régulation immune, comprenant des mutations gain de fonction ou perte de fonction. Ce type de mutation peut entraîner des modifications d'interactions stromales ou supprimer la réponse immune en réaction aux cellules lymphomateuses. Les gènes impliqués sont notamment *B2M*, *CD58*, *CIITA*, *TNFRSF9*, *TNFRSF14*, *PDL1*, *PDL2* et *EPHA7*.

Ces différents types d'altérations peuvent être associés⁷⁶.

3- Autres mécanismes d'activation de proto-oncogènes

Il existe d'autres mécanismes d'activation de proto-oncogènes dans les lymphomes, tels que l'amplification génomique². Par exemple, dans les DLBCL peuvent être mis en évidence des amplifications du gène *cREL*. L'utilisation de techniques de cytogénétique moléculaire telles que la CGH array (pour Comparative Genomic Hybridization) ou la SNP array (pour Single Nucleotide Polymorphism) sont susceptibles de mettre en évidence de nouveaux loci concernés par l'amplification.

4- Inactivation de gènes suppresseurs de tumeur

L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs peut survenir après mutation et/ou délétion. Le principal gène concerné est *TP53*. Comme dans les autres cancers, son inactivation provient fréquemment de la délétion d'un allèle et d'une mutation ponctuelle de l'autre allèle².

L'analyse cytogénétique des lymphomes révèle des délétions chromosomiques spécifiques récurrentes, suggérant la présence de gènes suppresseurs de tumeurs. Parmi elles, on retrouve la délétion du bras long du chromosome 6 (del(6q)), isolée ou non, généralement associée à un pronostic péjoratif². Il a été proposé que celle-ci entraîne la perte d'*HACE1* (pour HECT domain and Ankyrin repeat Containing E3 ubiquitin protein ligase 1), situé en 6q16 et potentiel gène suppresseur de tumeur⁷⁸. En effet, il est délété dans 40 % des LNH-B et une hyperméthylation de son promoteur est observée dans 60 % des cas. De plus, la sous-régulation de son expression dans des lignées cellulaires entraîne une diminution de l'apoptose et une accumulation en phase S et G2/M du cycle cellulaire. Le gène suppresseur de tumeur *FOXO3* (pour Forkheadbox O3) a également été proposé comme candidat⁷⁹. En



effet, il est situé dans la région minimale de délétion en 6q21 et son expression est significativement diminuée en cas de del(6q).

L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur peut aussi résulter de mécanismes épigénétiques, par hyperméthylation de régions promotrices, entraînant une inactivation transcriptionnelle. C'est le cas par exemple pour la perte d'expression de *p16* dans un certain nombre de LNH dont le lymphome folliculaire^{2,80}.

5- Transformation par les virus

Certains virus peuvent être impliqués dans la transformation des cellules B. En effet, les virus sont capables d'insérer leur génome dans leurs cellules cibles pouvant entraîner l'intégration d'un génome viral et/ou l'interruption de gènes endogènes².

Un exemple bien connu est celui de l'EBV (pour Epstein-Barr Virus) qui est retrouvé dans quasiment tous les cas de lymphome de Burkitt endémique, dans environ 40 % des lymphomes de Hodgkin classiques et dans de nombreux lymphomes post-transplantation⁴¹. La protéine LMP1 (pour Latent Membrane Protein 1) virale est capable d'activer la voie NFκB^{81,82}.

Le virus HHV8 (pour Human Herpes Virus 8) a également un pouvoir oncogénique via la protéine virale FLIP (pour FADD-like interleukine-1-β-converting enzyme-inhibitory protein) qui active le facteur de transcription NFκB⁸³.

D'autres agents pathogènes tels que le VIH (pour Virus de l'Immunodéficience Humaine), le VHC (pour Virus de l'Hépatite C) ont un rôle indirect sur le développement de LNH en altérant le système immunitaire et/ou en entraînant une stimulation antigénique chronique². Il a par exemple été montré que l'incidence des lymphomes liés à l'EBV chez les patients infectés par le VIH est élevée et que ceux-ci sont typiquement agressifs^{2,84}. Les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'EBV sont quantitativement normaux, mais ne fonctionnent pas correctement. En effet, ils perdent leur capacité à produire de l'interféron-γ en réponse aux peptides de l'EBV⁸⁵.



6- Activation du BCR

Les cellules B normales sont sélectionnées sur la présence d'un BCR fonctionnel et non autoréactif. Il semble que dans le cas des lymphomes B, la présence d'un BCR soit nécessaire pour la survie de la cellule. Ceci peut dépendre soit d'un signal autonome produit par le BCR, soit par une activation du BCR par l'antigène⁴¹. Dans la plupart des lymphomes B, le BCR est exprimé, même si parfois à des niveaux très bas comme dans la LLC. L'hypothèse selon laquelle un signal dépendant du BCR est nécessaire à la survie de la cellule B lymphomateuse est soutenue par le fait que les translocations impliquant les gènes des immunoglobulines affectent quasiment toujours l'allèle non productif⁴¹.

Plusieurs types de lymphomes dont le lymphome folliculaire et le lymphome de Burkitt, montrent l'apparition de mutations somatiques dites « ongoing », c'est-à-dire en cours au sein de la tumeur, sans pour autant perdre l'expression du BCR⁴¹. Pourtant, ces mutations entraînent dans environ 10 % des cas la perte de fonctionnalité du BCR par mutation, délétion ou duplication entraînant un décalage du cadre de lecture, dans des conditions sans sélection antigénique^{11,41}. Par conséquent, la persistance de l'expression d'un BCR dans ce type de lymphome suggère que ces cellules subissent une sélection. Ainsi, des signaux de survie seraient produits par l'expression du BCR de même que dans les cellules B normales⁴¹.

7- Inactivation du BCR

Dans de rares cas, les cellules du lymphome n'expriment pas de BCR. C'est le cas par exemple dans le lymphome de Hodgkin, le lymphome B post-transplantation, le lymphome à effusion primaire et le lymphome B médiastinal⁴¹.

Dans le lymphome de Hodgkin classique, des mutations inactivatrices des régions IGHV transforment des réarrangements des segments variables initialement fonctionnels en non fonctionnels dans environ 25 % des cas⁸⁶. Le nombre de mutations inactivatrices apparaissant dans les cellules B du centre germinatif est faible, ce qui suggère que les cellules de Hodgkin et de Reed-Sternberg dériveraient de cellules B du centre germinatif pré-apoptotiques⁴¹. Le mécanisme par lequel ces cellules arrivent à échapper à l'apoptose pourrait être expliqué par l'infection à l'EBV retrouvée dans environ 40 % des cas de Hodgkin classique. En effet les cellules infectées vont exprimer les protéines LMP1 et LMP2A (pour Latent Membrane Protein 2A). LMP1 est la principale protéine oncogénique de l'EBV. Elle mime la signalisation du CD40 et induit des voies de croissance et de survie, dont la voie NF- κ B.⁸⁷ LMP2A possède un domaine ITAM également retrouvé sur le CD79A et B au niveau du BCR. Il a été montré à partir de modèles murins transgéniques que l'expression de LMP2A peut remplacer la voie de signalisation médiée par le BCR⁸⁸. Ainsi, quand une cellule B du centre germinatif infectée par l'EBV va subir des mutations délétères pour le BCR, l'expression de LMP2A pourrait permettre



à la cellule d'échapper à l'apoptose. D'autres événements oncogéniques sont ensuite nécessaires pour permettre l'émergence du clone malin.

Dans les lymphomes B diffus à grandes cellules médiastinaux, l'expression du BCR est indétectable et les éléments de la cascade de signalisation du BCR sont régulés négativement⁴¹. L'activité de l'enhancer IgH est également diminuée, sans pour autant que des mutations inactivatrices des régions IGHV aient été mises en évidence⁸⁹. De même dans le lymphome à effusion primaire, l'expression du BCR est généralement faible à indétectable, sans mutation inactivatrice au niveau d'IGHV mise en évidence⁴¹. Dans ce type de lymphome, l'expression des facteurs de transcription PU.1, OCT2 (pour Organic Cation Transporter 2) et BOB1 (pour B-cell specific Octamer Protein 1), qui sont importants pour la régulation de la transcription de l'immunoglobuline, est diminuée⁹⁰. Ce type de lymphome perd généralement l'expression d'autres marqueurs B tels que le CD19 ou le CD20. Ceci indique une perte du phénotype B, de la même façon que dans le lymphome de Hodgkin classique. Cependant, d'autres aspects phénotypiques sont aussi compatibles avec une différenciation plasmablastique^{41,91}.

8- Activation par l'antigène

La stimulation par la liaison à l'antigène pourrait contribuer à la prolifération et la survie des cellules lymphomateuses⁴¹. Par exemple, dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), il a été montré que le BCR reconnaît fréquemment des auto-antigènes^{92,93}. Dans d'autres cas, les cellules de la LLC ont une spécificité pour des antigènes étrangers comme des protéines virales comme par exemple la protéine p24 d'HTLV1 (pour Human T-Lymphotropic Virus type 1)⁹⁴. L'étude des réarrangements des régions variables lourdes et légères dans la LLC a permis d'identifier plusieurs sous-groupes présentant des BCR hautement similaires. On parle de BCR stéréotypé. Il est possible que les cellules lymphomateuses dérivent d'un sous-groupe de cellules B non reconnues par les systèmes de contrôles et présentant un répertoire de segments V restreint, mais il est plus probable que cela soit le reflet d'une sélection et activation de ces cas par des types d'antigènes restreints^{95,96,97}. Cet aspect sera détaillé plus en détails dans le chapitre sur la LLC (Chapitre 2 : la leucémie lymphoïde chronique, page 79).

Un répertoire restreint des régions variables des immunoglobulines est une caractéristique du lymphome primitif du système nerveux central^{41,98}. Dans ce cas, seul le segment VH est concerné, ce qui indique que la liaison de l'antigène se produit exclusivement au niveau VH. Il s'agirait donc d'un superantigène, c'est-à-dire que le même antigène est capable d'interagir avec plusieurs immunoglobulines différentes. La stimulation de la cellule B par un superantigène pourrait donc être impliquée dans la pathogénèse de ce type de lymphome⁴¹.

Une activation du BCR par l'antigène serait aussi impliquée dans la pathogénèse du lymphome folliculaire⁴¹. De nombreux patients présentent des cellules lymphomateuses avec BCR autoréactif⁹⁹. De plus, elles présentent des mutations « ongoing » c'est-à-dire des mutations



successives provenant du processus d'hypermutation somatique, et ces mutations indiquent une sélection par l'antigène¹⁰⁰. Enfin, environ 80 % des cas de lymphomes folliculaires présentent des mutations somatiques des régions variables entraînant la formation de motifs liant les carbohydrates, dont la forte sélection suggère une implication dans la genèse du lymphome¹⁰¹.

Dans le cas de lymphomes B associés au VHC, il a été démontré que des antigènes viraux sont en cause dans la lymphomagénèse⁴¹. En effet, le BCR des cellules lymphomateuses interagit directement avec une protéine de l'enveloppe virale¹⁰². De plus, le traitement antiviral par interféron-alpha permet également une régression des cas de lymphomes B spléniques associés au VHC, alors que ce traitement n'entraîne pas de régression tumorale chez des patients atteints de lymphome B splénique VHC négatifs¹⁰³.

La stimulation des cellules de lymphome B par des antigènes du non soi peut également être indirecte via les lymphocytes T helper⁴¹. Ce serait le cas dans le lymphome du MALT gastrique associé à *Helicobacter pylori*. Dans ce cas, ce sont les lymphocytes T helper qui reconnaissent les antigènes bactériens et qui stimulent la prolifération des cellules lymphomateuses¹⁰⁴. Dans certains cas de lymphomes du MALT gastrique et salivaire, des auto-antigènes seraient reconnus par les cellules lymphomateuses, suggérant une potentielle synergie entre antigènes du non soi et auto-antigènes dans la lymphomagénèse^{41,105}.

9- Rôle du microenvironnement

Le microenvironnement tumoral semble important pour la survie et/ou la prolifération des cellules tumorales⁴¹. Dans le lymphome folliculaire, les lymphocytes tumoraux prolifèrent dans les centres germinatifs et sont en contact étroit avec les lymphocytes T helper et les cellules folliculaires dendritiques, comme dans un centre germinatif normal⁴¹. Certains lymphocytes tumoraux peuvent être retrouvés dans les régions interfolliculaires mais ils ont alors un faible index prolifératif, suggérant la nécessité du contact avec le microenvironnement cellulaire du centre germinatif pour proliférer¹⁰⁶. De plus, *in vitro*, ces cellules ne peuvent être cultivées qu'en présence de cellules T CD4+ ou de cellules stromales, avec un anticorps dirigé contre le récepteur CD40, dont l'activation dans les cellules du centre germinatif entraîne des signaux de survie^{107,108}.

Dans le cas de la LLC, les cellules tumorales circulantes ont un index prolifératif faible⁴¹. Les lymphocytes malins prolifèrent dans les ganglions et la moelle osseuse au sein de centres prolifératifs où ils sont en contact avec les lymphocytes T CD4+ et les cellules dendritiques.

Les cellules tumorales du lymphome de Hodgkin sont rares (< 1 %) et l'infiltrat cellulaire est principalement composé de lymphocytes T, de polynucléaires éosinophiles, de macrophages, de cellules B et de plasmocytes. Bien que cet infiltrat puisse traduire une réponse inflammatoire inefficace contre le lymphome, il semble qu'au moins une partie de ces cellules



soient attirées par les cellules tumorales. C'est le cas des lymphocytes T CD4+ recrutés par la production de la cytokine TARC (pour Thymus and Activation-Regulated Chemokine), normalement produite par les cellules dendritiques⁴¹. De plus, les cellules de Hodgkin expriment des molécules importantes pour l'interaction avec les lymphocytes T helper^{41,109}. Ceci semble indiquer un rôle de ces dernières dans la lymphomagénèse.

10- Rôle des ARN longs non codants

Les ARNs longs non codants (lncRNAs) constituent un groupe hétérogène d'ARNs de longueur supérieure à 200 nucléotides et représentant plus de la moitié du transcriptome non codant chez les mammifères¹¹⁰. Actuellement, plus de 100 000 lncRNAs sont répertoriés chez l'Homme, de nombreux loci entraînant la formation de différents transcrits¹¹⁰⁻¹¹³. Leur expression est régulée au cours du développement et peut être tissu- et cellule-spécifique. Ils permettent la régulation de l'expression génique aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel, ainsi que via la modification de la chromatine. Ils sont capables de recruter des complexes modifiant la chromatine, modulant la structure de l'hétérochromatine qui réprime l'expression génique. Ils peuvent également activer la transcription en renforçant des régions enhancer ou en induisant des modifications de conformation tri-dimensionnelle de la chromatine¹¹⁰. D'autres lncRNAs peuvent interagir avec des facteurs de transcription ou des protéines se liant à l'ARN pour réguler indirectement la transcription. De plus, ils peuvent entrer en compétition avec les microARNs (miARNs) en se liant aux ARNm, altérant ainsi indirectement l'expression génique. Enfin, les lncRNAs peuvent moduler les événements de transformation des ARNs tels que l'épissage, l'édition, la localisation, la traduction et la dégradation.

L'expression des lncRNAs est impliquée dans les processus d'oncogénèse ou de suppression de tumeur¹¹⁰. Des études montrent que la dérégulation de différents lncRNAs favorise la cancérogénèse, la progression de la maladie et les métastases. Dans les cancers solides, il a été démontré que les lncRNAs contribuent à toutes les caractéristiques du cancer, telles que la viabilité, la prolifération, la mobilité et l'angiogénèse¹¹⁴. Un exemple est celui de MALAT1 (pour Metastasis-Associated in Lung Adenocarcinoma Transcript 1), fortement exprimé dans différents types de tumeurs dont le cancer pulmonaire non à petites cellules et dont le rôle dans la migration cellulaire et la croissance tumorale a été démontré *in vitro*¹¹⁵. De plus en plus d'éléments suggèrent que les lncRNAs sont des acteurs importants dans l'hématopoïèse normale et maligne¹¹⁰. Une équipe a ainsi mis en évidence l'expression différentielle des lncRNAs au cours du développement des cellules B¹¹⁶. Par exemple, MYB-AS1 (pour MYB AntiSens RNA1, situé en 6q23.3), SMAD1-AS1 (pour Smad family member 1 AntiSens RNA1, situé en 4q31.21) et LEF1-AS1 (pour Lymphoid Enhancer binding Factor 1-Antisens RNA1, situé en 4q25) sont impliqués dans le développement lymphoïde B précoce. Il s'agit de transcrits antisens de facteurs de transcription impliqués dans les cellules B précoces (Figure 29)^{110,116}. RP11-132N15.3 (aussi appelé lnc-BCL6.3, situé en 3q27.3, environ 240 kb en amont de *BCL6*)



est exprimé dans les centroblastes et dans une moindre mesure dans les centrocytes. Il joue un rôle dans la modulation de la réaction GC et pourrait agir en régulant le répresseur transcriptionnel BCL6^{110,116}. De plus, l'étude du transcriptome dans les différents sous-types de cellules B au cours du développement montre que l'expression des lncRNAs est souvent restreinte à un subset, de façon plus spécifique que pour les gènes codant des protéines ou des récepteurs de membrane¹¹⁷. Les lncRNAs les plus spécifiques d'un type cellulaire n'étaient pas retrouvés dans des prélèvements de tissu lymphoïde entier ou de cellules mononuclées sanguines, probablement à cause de leur dilution parmi un grand nombre de cellules hétérogènes¹¹⁷. Il a également été démontré que l'expression différentielle des lncRNAs permet d'identifier l'engagement dès le stade de progéniteur vers les lignages lymphoïdes B ou T¹¹⁸.

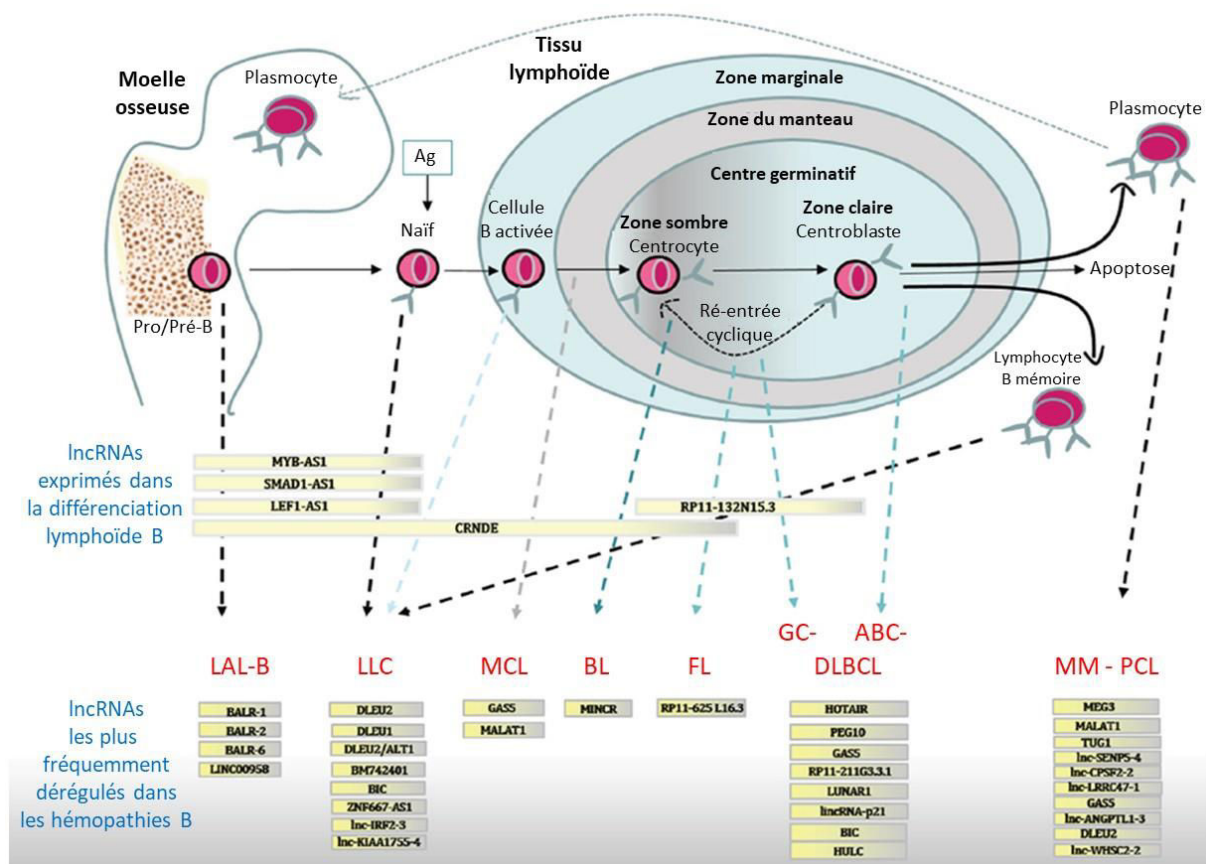


Figure 29 : lncRNAs exprimés au cours de la différenciation B et dans les hématopathies lymphoïdes B, adapté d'après Nobili *et al.*¹¹⁰.

LAL-B = Leucémie Aiguë Lymphoblastique B, MCL = Lymphome du manteau, BL = Lymphome de Burkitt, FL = lymphome folliculaire, MM = myélome multiple, PCL = Plasma Cell Leukemia (Leucémie à plasmocytes)



Actuellement, le rôle des lncRNAs dans les cancers est démontré et ils sont étudiés dans les hémopathies B. Certains sont déjà identifiés comme dérégulés dans les lymphomes B et leur nombre pourrait augmenter de façon exponentielle au cours des prochaines années¹¹⁰. Plusieurs équipes se sont intéressées à l'expression des lncRNAs dans différents types de lymphomes (Figure 29). Ceci sera développé dans le Chapitre 2 : la leucémie lymphoïde chronique (voir page 82 concernant la physiopathologie).

Les lncRNA peuvent également être dérégulés en cas de translocations. Un exemple dans le DLBCL est le lncRNA GAS5 (pour Growth Arrest Specific 5 situé en 1q25.1) retrouvé impliqué dans une translocation avec le gène *BCL6*¹¹⁹. Ce lncRNA joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose avec une activité suppressive de tumeur¹¹⁰. La translocation décrite entraîne la formation d'un transcrit de fusion *GAS5-BCL6* exprimé à partir du dérivé 3 de façon préférentielle par rapport à *BCL6* de l'autre chromosome 3. Dans le lymphome du manteau, des essais ont été réalisés sur des lignées cellulaires en sous régulant l'expression de *GAS5*, connu comme étant un effecteur de la voie mTOR (pour mammalian Target Of Rapamycin). Ceci entraîne une diminution des effets des antagonistes de la mTOR sur la viabilité cellulaire, la synthèse d'ADN et la capacité à former des colonies^{110,120}. Ainsi, la modulation de l'expression de *GAS5* pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique¹¹⁰.

11- Modèles de lymphomagenèse

Plusieurs modèles de lymphomagenèse peuvent être proposés selon le stade auquel les altérations vont se produire (Figure 30)⁷⁶. Dans un premier modèle, les différentes altérations se produisent à un stade donné unique de différenciation lymphocytaire. Dans un deuxième modèle, les cellules acquièrent des modifications initiales lors des stades précoces de la différenciation lymphoïde qui peuvent être à l'origine d'une expansion clonale ou d'une résistance à l'apoptose, puis ces cellules vont développer des modifications additionnelles à des stades de différenciations plus tardifs. Dans le troisième modèle, les altérations initiales apparaissent au niveau de progéniteurs non engagés dans une lignée et ayant des capacités d'auto-renouvellement de façon inhérente ou par acquisition via altérations. Comme dans le deuxième modèle, ces cellules vont acquérir des altérations additionnelles au cours de la différenciation lymphoïde. Au cours des stades de développement ultérieurs, les cellules peuvent conserver des capacités d'auto-renouvellement et ainsi former des réservoirs pour diversification clonale.



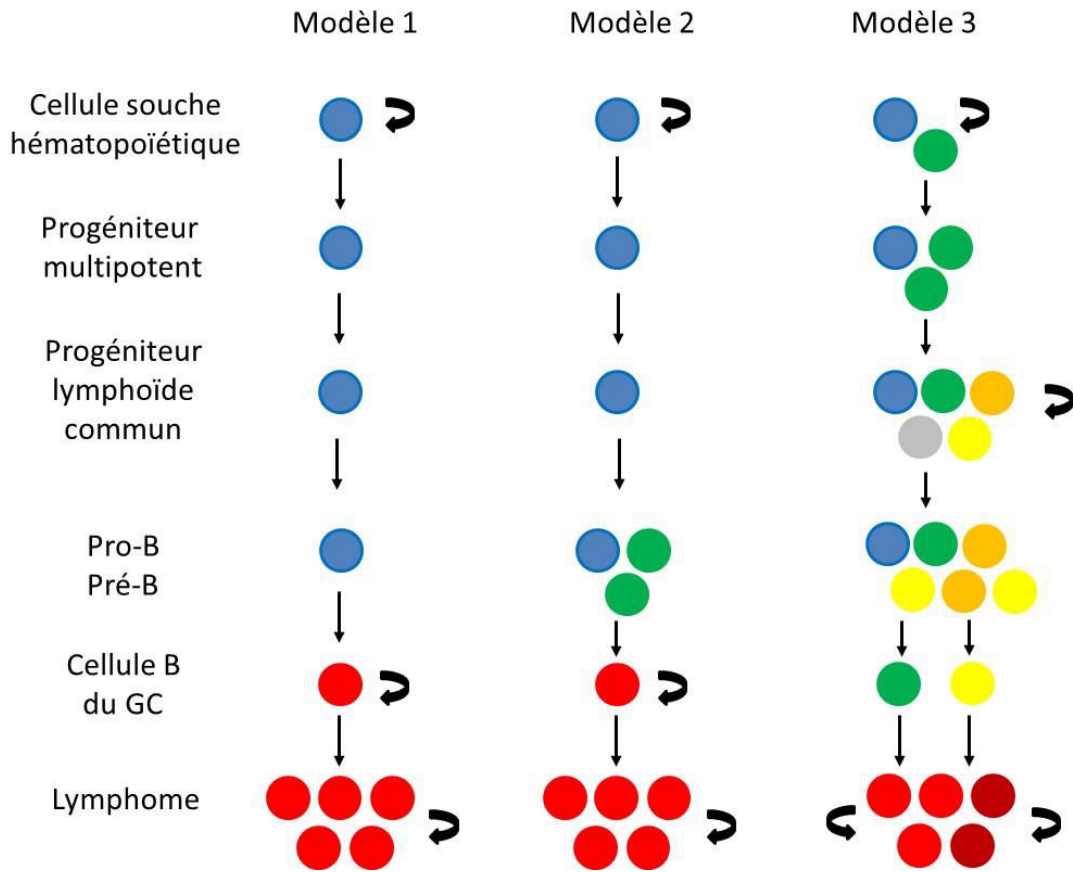


Figure 30 : Les 3 modèles de lymphomagénèse, adapté d'après Weigert et Weinstock⁷⁶.

Le lymphome de Burkitt sporadique pourrait constituer un exemple du modèle 1, l'origine cellulaire supposée étant les centroblastes du GC et les lésions génétiques primitives se produisant au niveau du GC⁷⁶. Le lymphome de Burkitt endémique serait un exemple du modèle 2, dans la mesure où l'apparition de la translocation *MYC-IGH* ferait intervenir RAG au cours du processus de réarrangement VDJ⁷⁶. Enfin, indépendamment du moment où se produisent les altérations génétiques au cours de la transformation lymphoïde, il semble exister des relations hiérarchiques : ainsi, des sous-clones à des stades de différenciation donnés et présentant des capacités d'auto-renouvellement peuvent entraîner l'émergence d'une population tumorale exprimant un phénotype différent. Ce serait le cas dans le myélome et le lymphome de Hodgkin dans lesquels une population de cellules B mémoires présente les mêmes réarrangements des gènes des immunoglobulines que le clone tumoral et pourrait constituer un réservoir de propagation de cellules tumorales, comme dans le modèle 3⁷⁶.

