



HAL
open science

Oncogénèse des lymphomes cutanés B

Anne Liên Pham-Ledard

► **To cite this version:**

Anne Liên Pham-Ledard. Oncogénèse des lymphomes cutanés B. Génétique. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0319 . tel-01450051

HAL Id: tel-01450051

<https://theses.hal.science/tel-01450051>

Submitted on 31 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ GENETIQUE

par Anne PHAM épouse LEDARD

née le 1er novembre 1981 à Nantes

ONCOGENESE DES LYMPHOMES CUTANES B

Sous la direction du Pr Jean-Philippe MERLIO

Soutenue le 16 décembre 2014

Membres du jury :

Mme le Pr Martine BAGOT, Université Paris Diderot, INSERM UMR-S-976	Président
Mme le Pr Christiane COPIE-BERGMAN, Université Paris Est Créteil, INSERM U955	Rapporteur
M. le Pr Fabrice JARDIN, Université de Rouen, INSERM U918	Rapporteur
M. le Pr Selim ARACTINGI, Université Pierre et Marie Curie, INSERM UMR-S-938	Examineur
M. le Pr Pierre SOUBEYRAN, Université de Bordeaux, INSERM U916	Examineur
Mme le Pr Marie BEYLOT-BARRY, Université de Bordeaux, EA2406	Examineur
M. le Pr Jean-Philippe MERLIO, Université de Bordeaux, EA2406	Directeur
M. le Pr François-Xavier MAHON, Université de Bordeaux, INSERM U1035	Membre invité

Titre : oncogenèse des lymphomes cutanés B

Résumé : Les lymphomes cutanés primitifs B comprennent 2 formes indolentes (lymphomes des centres folliculaires et de la zone marginale) et une forme clinique agressive, le lymphome B diffus à grandes cellules de type jambe. Si le lymphome des centres folliculaires ne présente le plus souvent pas la translocation t(14;18) à l'origine d'une dérégulation de BCL2 caractéristique des lymphomes folliculaires ganglionnaires, elle peut être identifiée en FISH dans 8,7% des cas et représenter un risque d'extension extra-cutanée. En revanche, l'étude de l'oncogenèse des lymphomes B de type jambe révèle des mécanismes communs d'oncogenèse avec les lymphomes B diffus à grandes cellules ganglionnaires, avec une répartition différente des altérations. Notamment, la mutation du gène *MYD88*^{L265P} qui encode une protéine adaptatrice de la voie des Toll-like récepteurs responsable de l'activation constitutive de la voie NFκB, est très fréquemment observée (69% des cas) et est associée à une survie spécifique plus courte. De plus, contrairement aux autres lymphomes cutanés B, les cellules tumorales sont porteuses de multiples anomalies comme des translocations ou des délétions. D'autres arguments issus de l'analyse des séquences des gènes des immunoglobulines nous permettent de présumer que la cellule d'origine est un lymphocyte B mature, post-centre germinatif. Le fort taux de mutations identifiées reflète l'hypermutation somatique acquise à l'occasion du passage par le centre germinatif, mais l'expression d'un isotype primaire d'anticorps (IgM) suggère un blocage de la différenciation plasmocytaire terminale notamment pour la commutation isotypique.

Mots clés : lymphome cutané B, oncogenèse, mutation

Title : B-cell cutaneous lymphomas oncogenesis

Abstract : Cutaneous B-cell lymphomas are represented by indolent B-cell lymphomas (follicle center and marginal zone), and primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type which is characterized by an aggressive behavior. Primary cutaneous follicle center lymphoma usually do not harbor the t(14;18) translocation, which is characteristic of nodal follicular lymphoma and conduct to BCL2 overexpression. However, it can be observed by FISH in 8.7% of cutaneous cases and seems to be associated with extra-cutaneous disease. In contrast, primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type shows common genetic alterations with its nodal counterpart diffuse large B-cell lymphoma, suggestive of common oncogenesis pathways, with distinct frequencies and repartition of mutations. Especially, the *MYD88*^{L265P} mutation that encodes an important adaptator protein of the Toll-like receptor pathway, activating NFκB, is very frequent (69% of cases) and associated with a shorter specific survival. Moreover, contrary to indolent primary cutaneous B-cell lymphoma, tumour cells often harbor multiple genetic alterations such as translocations and deletions. The analysis of the immunoglobulin genes sequences led us to suppose that the cell of origin could be a post germinal-center mature B-cell. Highly mutated sequences are the reflection of the germinal center passage, but IgM expression suggests a terminal differentiation blockage, notably with a class switch recombination defect.

Keywords : cutaneous B-cell lymphoma, oncogenesis, mutation

Unité de recherche : EA2406 Histologie et pathologie moléculaire des tumeurs

Université de Bordeaux - Bat 3B, Niveau 2, Campus Carreire-Zone Nord.
146, rue Léo Saignat
33076 BORDEAUX, FRANCE

Remerciements

A mon maître et juge, Mme le Pr Marie Beylot-Barry (Université de Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque, EA2406). Merci pour ton enseignement depuis le début d'internat, ton soutien, tes idées, ton aide et aussi pour la confiance que tu m'as accordée tout au long de ces années de thèse. J'espère être à la hauteur. Tu es un guide pour moi, et j'espère que nous allons poursuivre ensemble ces travaux scientifiques, parallèlement à l'activité clinique qui nous permet de leur donner une cohérence. Je te remercie profondément.

A mon maître et directeur de thèse: M. le Pr Jean-Philippe Merlio (Université de Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque, EA2406). Merci pour votre enseignement, votre encadrement, vos idées, votre dynamisme... dont j'ai pu bénéficier en tant qu'étudiante en thèse. J'espère aussi continuer à travailler à vos côtés dans les années à venir. Veuillez trouver ici le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

A mes rapporteurs, M. le Pr Fabrice Jardin (Université de Rouen, Centre Henri Becquerel, INSERM U918), Mme le Pr Christiane Copie-Bergman (Université Paris Est Créteil, Hôpital Henri Mondor, INSERM U955 eq9). Merci d'avoir accepté de rapporter mon travail de thèse. Merci pour le temps que vous avez consacré à ce travail. Vos travaux respectifs dans le domaine de l'hématologie sont des exemples pour moi. Veuillez accepter mes remerciements et croire en ma sincère gratitude.

A ma présidente du jury et juge, Mme le Pr Martine BAGOT (Université Paris Diderot, Hôpital Saint-Louis, Paris, INSERM UMR-S-976). C'est un grand honneur pour moi de pouvoir bénéficier de votre expérience et de vos connaissances dans le domaine des lymphomes cutanés, je vous remercie profondément d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez croire en l'expression de ma plus haute considération.

A mes juges, M. le Pr Pierre SOUBEYRAN (Université de Bordeaux, INSERM U916), M. le Pr Selim ARACTINGI (Université Pierre et Marie Curie, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, INSERM UMR-S-938). Vous me faites l'honneur de faire partie de ce jury de thèse. Recevez ici le témoignage de ma vive reconnaissance.

A mon tuteur, Mr le Pr François-Xavier MAHON (Université de Bordeaux, INSERM U1035). Vous m'avez guidée et soutenue durant ces années de thèse. Veuillez accepter mes sincères remerciements.

A ma famille, Arthur, Céleste et Eliott. A mon père, et à Anne et Marc, mes beaux-parents. Merci .

A mes amis, mes collègues, souvent les deux, qui m'ont aidée à élaborer ce travail.

- **Antoine**, merci pour ta compétence, disponibilité et bonne humeur,
- **Emilie**, merci pour ces mois travaillés ensemble,
- **Martina**, merci pour ton aide au quotidien dans les manips, et pour tout le reste!
David, Elodie, Edith, Laetitia, Yamina merci aussi à vous tous.

A toute l'équipe du laboratoire EA2406 : Merci de m'avoir accueillie, épaulée, encouragée.

A toute l'équipe médicale et paramédicale du service de dermatologie de Haut-Lévêque. Médecins, infirmières, aides-soignantes, secrétaires, ARCs... Merci pour votre aide au quotidien.

A mes internes, avec qui j'aime travailler, en espérant que certains auront peut être une curiosité pour la recherche.

A l'équipe du laboratoire d'Anatomopathologie de l'hôpital Haut-Lévêque: Pr Béatrice Vergier, Dr Marie Parrens, Pr Antoine De Mascarel. Merci pour les discussions autour du microscope, qui nous permettent d'avancer. Merci aux techniciennes pour leur aide précieuse.

A l'équipe du service de biologie des tumeurs: David Cappellen, Fabian Martinez, Nathalie Carrere, Charline, Audrey. Merci pour votre aide.

Au Groupe Français pour l'étude des lymphomes cutanés. Merci pour les collaborations qui ont permis de mener à bien certains aspects de ces travaux. Merci au Pr Florent Grange pour sa disponibilité et son aide précieuse.

A la Société Française de Dermatologie, qui nous a attribué une bourse de recherche pour la réalisation du travail « Intérêt de la détection de la translocation t(14;18) dans les lymphomes des centres folliculaires à présentation cutanée : étude de 53 cas ».

Aux patients, sans qui nos travaux n'auraient pas d'intérêt. Merci à eux pour leur consentement et leur intérêt vis à vis de ces recherches.

Table des matières

PARTIE I: INTRODUCTION	9
A. Ontogenèse des lymphocytes B	13
1. La lymphopoïèse (phase indépendante de l'antigène)	13
2. L'immunopoïèse (différenciation dépendante de l'antigène)	19
a. La phase pré-centre germinatif	20
b. Phase de la réaction du centre germinatif	21
a. Phase post centre-germinatif: différenciation en lymphocyte B mémoire ou en plasmocyte	27
3. Voies alternatives à la formation des centre germinatifs	29
B. Les lymphomes B	31
1. Classification des lymphomes	31
2. Mécanismes pouvant être à l'origine des anomalies moléculaires dans les lymphomes	35
3. Les lymphomes cutanés B	37
a. Lymphome B cutané primitif de la zone marginale (LCP-ZM)	37
b. LCP des centres folliculaires	38
c. Lymphome cutané B diffus à grandes cellules de type jambe (LCBDGC-TJ)	40
d. Parallèle entre les lymphomes cutanés B et les lymphomes ganglionnaires	42
4. Les lymphomes B ganglionnaires	45
5. Lymphomes B diffus à grandes cellules NOS: données cytogénétiques et moléculaires.	46
a. Mutations et anomalies identifiées principalement dans les LBDGC de type GC	49
b. Mutations et anomalies identifiées principalement dans les LBDGC de type ABC	52
c. Importance du microenvironnement: signatures stromales, angiogenèse et microARNs	58
PARTIE II: RESULTATS	63
A. Première partie: étude du statut du gène <i>MYD88</i> au sein des lymphomes cutanés diffus à grandes cellules de type jambe	65
1. Contexte scientifique	65
2. Objectifs et méthodologie	66
3. Résultats et conclusions	66
4. Publications: 2 articles	67
B. Deuxième partie: étude en FISH des anomalies génétiques associées aux lymphomes B diffus à grandes cellules de type jambe.	81
1. Contexte scientifique	81
2. Objectifs et méthodologie	81
3. Résultats et conclusion	81
4. Publication: 1 article	82
C. Troisième partie: étude des caractéristiques du gène <i>IGHV</i> dans les LCBDGC de type jambe.	93
1. Contexte scientifique	93
2. Objectifs et méthodologie	94
3. Résultats et conclusion	94

D. Quatrième partie: étude de la translocation t(14;18) dans les lymphomes cutanés B des centres folliculaires	113
1. Contexte scientifique	113
2. Objectifs et méthodologie	113
3. Résultats et conclusions.....	113
4. Publication: 1 article accepté	115
PARTIE III: DISCUSSION ET PERSPECTIVES	137
A. Conclusions et discussion générale	139
1. Développement d'outils utiles à la prise en charge des malades atteints de lymphomes cutanés B....	139
LCP des centres folliculaires	139
LCBDGC de type jambe.....	140
2. Avancée des connaissances sur l'oncogénèse des LCBDGC de type jambe.....	141
B. Perspectives	143
1. Poursuite des travaux afin de préciser l'oncogénèse des LCBDGC-TJ.....	143
Cellule d'origine: exploration des séquences "switch"	143
NGS des LCBDGC-TJ.....	144
Etude des profils d'expression des LCBDGC-TJ.....	144
Exploration du microenvironnement	145
2. Mise au point de modèles d'étude	145
3. Applications cliniques et thérapeutiques.....	146
Mise au point de la détection d'ADN tumoral circulant par PCR digitale dans les LBDGC cutanés et ganglionnaires	146
Essais thérapeutiques.....	147
Références bibliographiques	151

Liste des abréviations

<p style="text-align: center;">-A-</p> <p>ABC: Activated B-cell Ag: Antigène AID: Activation-induced cytidine deaminase AKT: Protein Kinase B ARNm: ARN messenger</p>	<p style="text-align: center;">-L-</p> <p>LBDGC: Lymphome B Diffus à grandes cellules LCB: Lymphome cutané B LCB-CF: Lymphome cutané B des centres folliculaires LCB-ZM: Lymphome cutané B de la zone marginale LCB-DGC-TJ: Lymphome cutané B diffus à grandes cellules de type jambe</p>
<p style="text-align: center;">-B-</p> <p>BCR: B-cell receptor BCL2: B-cell lymphoma 2 BCL6: B-cell lymphoma 6 BCL10: B-cell lymphoma 10 BLIMP1: B-lymphocyte-Induced Maturation Protein 1 BTK: Bruton's Tyrosine Kinase</p>	<p style="text-align: center;">-M-</p> <p>MALT: Mucosa Associated Lymphoid Tissue MAPK: Mitogen Associated Protein Kinase miRNA: microARN MLL2: Mixed lineage leukemia protein 2 MMP: Matrix MetalloProtease mTOR: Mammalian Target Of Rapamycin MUM1: Multiple Myeloma oncogene 1 MYD88: Myeloid differentiation primary response gene 88</p>
<p style="text-align: center;">-C-</p> <p>CD: Cluster Differentiation CDR: Complementary Determining Region CG: Centre Germinatif CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène CSR: Class Switch Recombination CXCL12: CXC Chemokine Ligand 12</p>	<p style="text-align: center;">-N-</p> <p>NFκB: Nuclear Factor Kappa B NGS: Next Generation Sequencing NOS: Not Otherwise Specified</p>
<p style="text-align: center;">-E-</p> <p>EBV: Epstein-Barr Virus EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer</p>	<p style="text-align: center;">-O-</p> <p>OMS: Organisation Mondiale de la Santé</p>
<p style="text-align: center;">-F-</p> <p>FDC/CFD: Follicular Dendritic Cell</p>	<p style="text-align: center;">-P-</p> <p>PAX5: Paired Box Protein 5 PI3K: Phosphoinositide 3-kinase PKC: Protein Kinase C PRDM1: PR domain zinc finger protein 1 (ou BLIMP1) PTEN: Phosphatase and TENSin homologue</p>
<p style="text-align: center;">-G-</p> <p>GC: Germinal Center</p>	<p style="text-align: center;">-R-</p> <p>RAG: Recombination Activating Gene</p>
<p style="text-align: center;">-I-</p> <p>Ig: Immunoglobuline IGV: Variable region of the Immunoglobulin gene IL: Interleukine IRF4: Interferon Regulatory Factor 4 IRF8: Interferon Regulatory Factor 8 ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs</p>	<p style="text-align: center;">-S-</p> <p>SHM: Somatic Hypermutation</p>
<p style="text-align: center;">-J-</p> <p>JAK: Janus Kinase</p>	<p style="text-align: center;">-T-</p> <p>TCR: T-cell receptor TdT: Terminal deoxybucleotidyl Transférase TNFAIP3: Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3 (ou A20)</p>
	<p style="text-align: center;">-V-</p> <p>VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor VH: Variable region of the heavy chain</p>
	<p style="text-align: center;">-W-</p> <p>WHO: World Health Organization</p>

PARTIE I: INTRODUCTION

Les lymphomes B représentent un groupe très hétérogène de proliférations malignes développées à partir des lymphocytes B, reflétant probablement la complexité des processus de différenciation normaux depuis la cellule souche médullaire jusqu'au plasmocyte. En effet, la lymphopoïèse B ou phase indépendante de l'antigène dans la moelle osseuse, puis l'immunopoïèse ou phase dépendante de l'antigène en périphérie, aboutissent à la production de cellules effectrices assurant en coopérant avec d'autres acteurs les défenses immunitaires notamment la production d'anticorps et la constitution d'un répertoire de lymphocytes B mémoire.

Si un dérèglement de la balance survie/apoptose survient au cours du processus de maturation des lymphocytes B, une prolifération incontrôlée peut survenir, à l'origine de la formation de lymphomes B. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes de développement et de maturation de la lignée lymphocytaire B est importante lorsque l'on s'intéresse aux lymphomes B. Ces mécanismes sont liés intrinsèquement à l'immunité adaptative, bien plus efficace que l'immunité innée sollicitée en première ligne, de part son système de reconnaissance spécifique et adaptable du pathogène. Les effecteurs cellulaires de cette deuxième ligne de défense sont les lymphocytes B et T capables d'identifier spécifiquement un agresseur, tout en tolérant le soi. Cette immunité tire sa particularité du répertoire très varié de récepteurs aux antigènes associé aux lymphocytes T (TCR) ou B (BCR), représenté par les milliards de lymphocytes formés au sein d'un organisme. Les lymphocytes T auxiliaires sont les premiers à être alertés par la présence d'un antigène (Ag) qui leur est présenté via les molécules du soi du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ils sont au cœur de la coopération cellulaire grâce aux cytokines qu'ils sécrètent lors de leur activation, et vont permettre aux lymphocytes B ayant reconnu l'antigène de s'activer. L'activation lymphocytaire B provoque sa maturation, qui nécessite la formation au sein des organes lymphoïdes de centre germinatifs. Ces différentes étapes de maturation conduisant à la "spécialisation" du lymphocyte s'accompagnent de modifications moléculaires de certains gènes au sein de ces cellules telles que l'hypermutation somatique et/ou commutation de classe, notamment au niveau du gène des immunoglobulines. De plus la présence et le type de l'immunoglobuline exprimée en surface des lymphocytes se modifient au cours de la différenciation lymphoïde. L'analyse moléculaire de ces régions géniques, ainsi que l'analyse des immunoglobulines de surface peut donc permettre de préjuger de la cellule à l'origine de tel ou tel lymphome B.

La classification actuelle des lymphomes publiée par l'organisation mondiale de la santé ou WHO, repose sur un ensemble de critères cliniques, morphologiques, immunophénotypiques et cytogénétiques de ces tumeurs. L'identification de la "cellule d'origine" a été faite à chaque fois que possible, et le démantèlement des altérations génétiques associées aux tumeurs peut parfois permettre de classer des entités "non classifiables", et ainsi apporter un outil diagnostique supplémentaire. D'autres altérations géniques peuvent être associées à un comportement clinique particulier ou à un profil de

réponse au traitement, apportant cette fois une valeur pronostique ou théranostique utile en pratique clinique.

L'objectif de ce travail était de déterminer si cette classification en cellule d'origine pouvait s'appliquer aux lymphomes cutanés B, qui sont primitivement développés au niveau du revêtement cutané, pathologies où les connaissances en termes de d'oncogenèse sont relativement pauvres, contrairement à leur équivalent ganglionnaire. L'essor des connaissances concernant la lymphomagenèse des lymphomes B ganglionnaires représente un moteur incitant à explorer l'oncogenèse des lymphomes cutanés. Le comportement clinique distinct entre lymphome cutané B et lymphome B ganglionnaire a permis de classer les lymphomes cutanés B (sauf pour les lymphomes cutanés B de la zone marginale) comme entité distincte au sein de classification actuelle des lymphomes (WHO 2008), même si les caractéristiques morphologiques ou phénotypiques des cellules tumorales sont proches. En revanche, la présence des mêmes altérations génétiques ou cytogénétiques connues chez leur contrepartie ganglionnaire la plus proche ont été peu étudiée alors qu'on sait qu'à type histologique égal des lymphomes peuvent porter ou non une altération génétique selon leur site de développement (Delsol 2010).

Dans la première partie d'introduction, nous ferons quelques rappels physiologiques sur la différenciation lymphoïde B normale (lymphopoïèse puis immunopoïèse), afin de pouvoir appréhender ensuite les mécanismes qui peuvent être à l'origine des anomalies moléculaires associées aux lymphomes. Ensuite, nous présenterons la classification actuelle WHO 2008 des lymphomes. En un court chapitre, nous aborderons sur les lymphomes cutanés B, en détaillant la clinique, l'anatomopathologie, et un point bibliographique sur les connaissances en termes d'oncogenèse pour chaque type de lymphome B. Puis nous présenterons les lymphomes B ganglionnaires, et en particulier les lymphomes B diffus à grandes cellules, qui sont le type le plus fréquent, et le type le plus proche des lymphomes B diffus à grandes cellules de type jambe qui a représenté la majorité de nos travaux de thèse.

A. Ontogenèse des lymphocytes B

1. La lymphopoïèse (phase indépendante de l'antigène)

La lymphopoïèse B ou lymphopoïèse primaire correspond à la production de lymphocytes B exprimant un récepteur à l'antigène (BCR ou B-cell receptor) à partir d'une cellule souche hématopoïétique multipotente, au niveau de la moelle osseuse chez l'homme, le foie chez le fœtus (Matthias et Rolink 2005). Les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine de toutes les cellules sanguines et donc des lymphocytes: le progéniteur lymphoïde T va migrer dans le thymus et le progéniteur lymphoïde B reste dans la moelle osseuse (LeBien et Tedder 2008). Elles sont caractérisées par leur potentiel de différenciation en de multiples lignées (multipotence), leur grande capacité d'auto-renouvellement et la présence à leur surface du marqueur CD34 caractéristique des cellules souches multipotente et des progéniteurs.

Le BCR (Figure 1) est un complexe moléculaire formé d'une immunoglobuline M (IGM) membranaire complète (2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères) et d'un hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79a/CD79b), phosphoprotéines membranaires à motifs ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activating motif*) dont les domaines cytoplasmiques servent de substrat pour les protéines tyrosine kinases de la famille Src et ainsi initieront la transduction du signal vers le noyau (Berry et al. 2011). Avant d'exprimer à sa surface un BCR complet, chaque lymphocyte B exprime temporairement, au stade initial de sa différenciation, un "substitut de récepteur" ou pré-BCR.

Les interactions avec les cellules stromales médullaires et l'influence de diverses cytokines dont CXCL12 produite par la stroma médullaire, ou CXCR4 son récepteur présent en surface des cellules souches hématopoïétiques et sur les lymphocytes B sont indispensables à la différenciation des précurseurs B lymphoïdes (LeBien 2000).

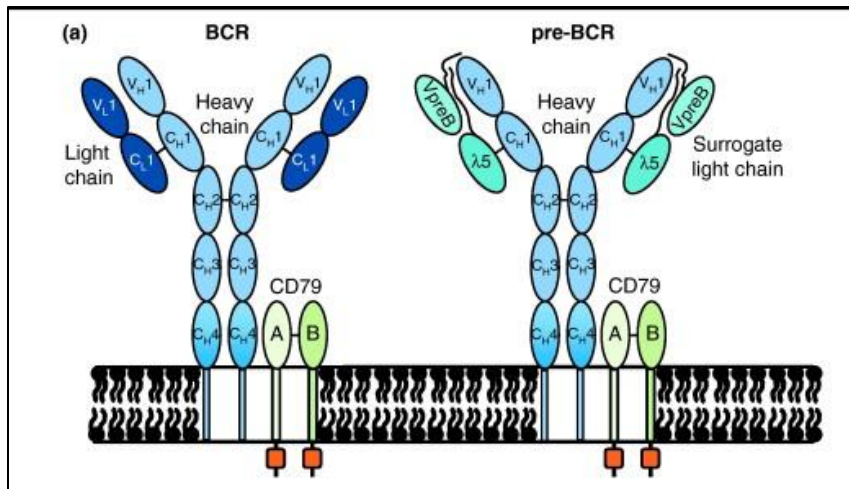


Figure 1. Structure schématique du récepteur à l'antigène des lymphocytes B (BCR) (Berry et al, Trends in Immunology, 2011). Le BCR est représenté comprenant une immunoglobuline complète (ou incomplète pour le pré-BCR avec une pseudo-chaîne légère) et l'hétérodimère CD79a/CD79b à motifs ITAM (en orange).

Le premier stade est celui de **lymphocyte pro-B**, CD34+ CD117+. Le réarrangement des gènes de chaînes lourdes des immunoglobulines débute à ce stade et des chaînes lourdes des IgM sont détectables au niveau du cytoplasme (LeBien 2000). Ce réarrangement par recombinaison génétique (figure 2) va transformer des gènes d'Ig très longs et non fonctionnels en gènes plus courts, capables de synthétiser une chaîne lourde (H pour "heavy") ou une chaîne légère (L pour "light") kappa ou lambda. La fonction de ces remaniements géniques est de générer un répertoire aléatoire de spécificités antigéniques, dont certaines seront sélectionnées lors d'un contact ultérieur avec l'antigène et amplifiées.

Le locus *IGH* (gène codant pour la chaîne lourde) est situé en 14q32.33, le locus *IGK* (gène codant pour la chaîne légère κ) en 2p11.12 et le locus *IGL* (gène codant pour la chaîne légère λ) en 22q11. Chaque locus comporte quelques dizaines de gènes V (variable) et un nombre limité de segments J (jonction: 6JH, 5J κ , 4 à 5 C λ) et de gènes constants (9CH, 1C κ , 4 C λ) fonctionnels. De plus le locus *IGH* comprend environ 23 segments de diversité D. Le locus *IGH* s'étend sur 1350 kb et contient 87 gènes *VH* dont 39 à 46 fonctionnels appartenant à 7 familles *VH*.

La recombinaison met en jeu un complexe enzymatique désigné globalement sous le nom de recombinaise. Il s'agit de protéines codées par les gènes *RAG-1* et *RAG-2* (*recombining activating gene*), de l'hétérodimère Ku70-Ku80, de la protéine kinase ADN dépendante (DNA PK) et d'autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Les séquences nucléotidiques situées en 3' de chaque gène V, en 5' de chaque gène J et de part et d'autre des gènes D contiennent des séquences signal de recombinaison (RSS) qui sont des séquences palindromiques de 7 nucléotides et 9 nucléotides séparées par une séquence "spacer" peu conservée de 12 ou 23 nucléotides (Küppers et Dalla-Favera 2001). Ces motifs sont la cible des recombinaises RAG-1 et RAG-2 qui vont générer des cassures double brin. La

réparation de ces cassures est ensuite assurée par un système de jonction d'extrémités non homologues. L'appariement des séquences, lié à la complémentarité des motifs RSS, va mettre continuellement bout à bout successivement un segment D et un segment JH, puis ce segment réarrangé DJH avec un segment VH (figures 2 et 3). Les régions d'ADN comprises entre les différents segments sont délétées lors de ces réarrangements sous forme d'un ADN circulaire ou épisode (figure 3). Dans le cas des chaînes légères, la recombinaison s'effectue si l'étape de recombinaison VH-DH-JH a été fonctionnelle et permet l'expression d'une chaîne lourde μ . Les endonucléases RAG vont alors effectuer le même type de cassure double brin sur les séquences signal de recombinaison, assurant la recombinaison entre un gène V (κ puis λ) et un segment J (κ puis λ) (Küppers et Dalla-Favera 2001).

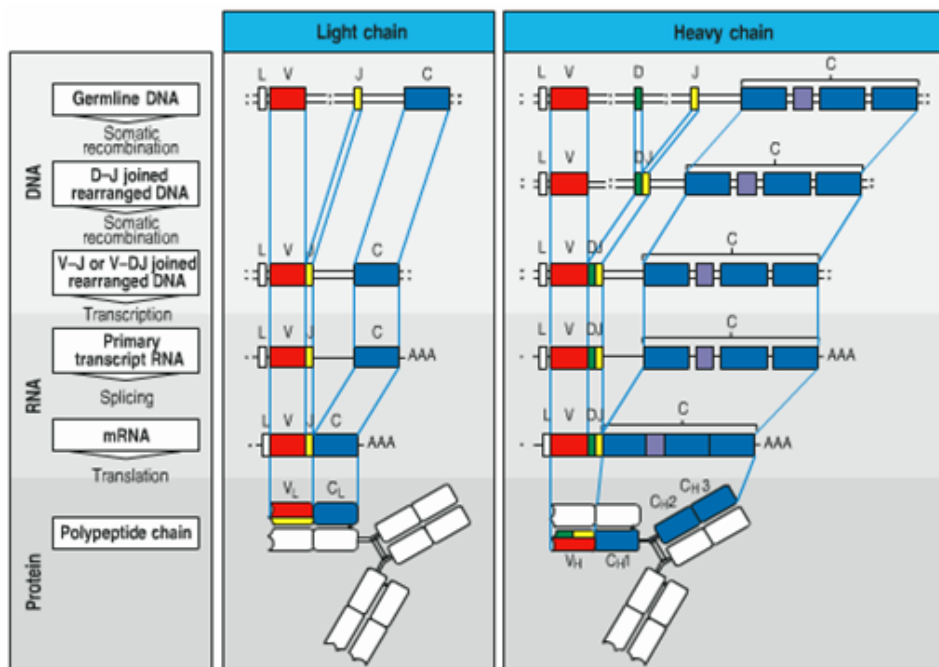


Figure 2: Mécanismes de recombinaison à l'origine des gènes permettant l'expression des chaînes lourdes (à gauche) et des chaînes légères (à droite) des immunoglobulines (D'après Charles A. JANEWAY et Paul TRAVERS, immunobiologie, 2ème Ed, 1996).

Chaîne lourde (à gauche): Le processus de recombinaison qui génère une région variable de chaîne lourde se déroule en 2 étapes. Un segment de gène Diversité (D) est joint à un segment de gène Jonction (JH), ensuite un segment de gène variable (VH) est réarrangé avec le segment DJH, produisant ainsi le segment de gène codant pour la région variable. La séquence codant pour cette région variable est reliée à la région constante par épissage de l'ARN.

Chaîne légère (à droite): Le gène est construit par recombinaison somatique d'un segment de gène variable (V) et Jonction (J). La région constante CL est codée dans un exon séparé qui est réuni au gène V par épissage de l'ARN.

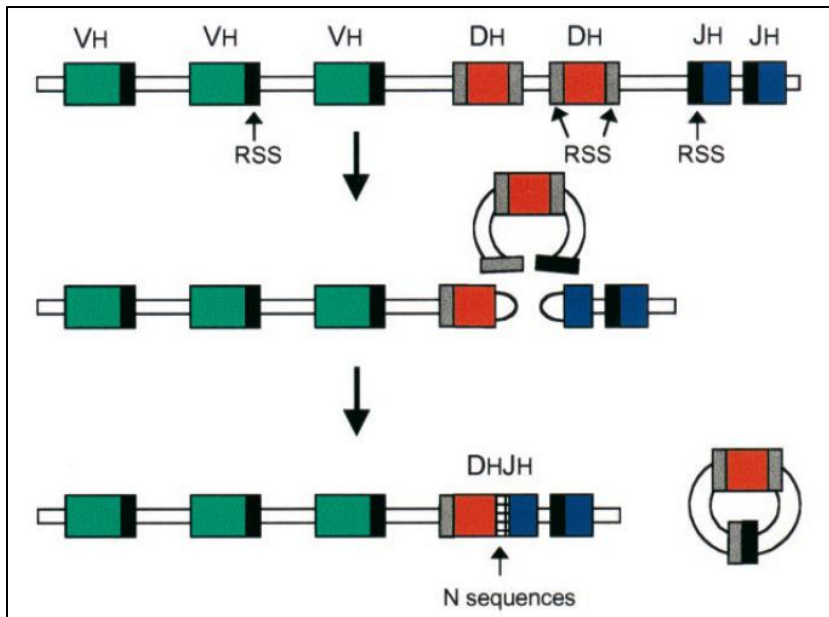


Figure 3: Recombinaison VDJ (Kuppers et Dalla-Favera, Oncogène, 2001). Les recombinases RAG-1 et RAG-2 coupent l'ADN au niveau des séquences conservées signal de recombinaison RSS, qui flanquent les segments réarrangés (ici un segment DH et JH).

Tous les segments VH, DH, JH (ou V_{κ} , J_{κ} - V_{λ} , J_{λ}) peuvent en principe s'associer, permettant ainsi au génome de coder plus de 2×10^6 paratopes différents: c'est la **diversité combinatoire**. Deux autres mécanismes viennent accroître cette diversité: la diversité jonctionnelle qui a lieu lors de cette étape de recombinaison, et l'hypermutation somatique lors de la réaction du centre germinatif qui sera détaillée ensuite.

La diversité jonctionnelle apparaît lors de la recombinaison V(D)J, et permet d'augmenter encore la diversité créée par les mécanismes de recombinaison. Les mécanismes de réparation de l'ADN créent une variabilité dans les zones de jonction entre les gènes associés et la position précise à laquelle les segments V(D)J se joignent peut légèrement varier. Ces modifications introduisant des variations de nombre de nucléotides, peuvent modifier le cadre de lecture pour D et J à l'origine d'un degré de diversité supplémentaire par délétion ou insertion de nucléotides dans les régions variables des immunoglobulines.

Au niveau des segments codants on trouve deux types d'insertion nucléotidique:

- les insertions "non-templated" où jusqu'à 15 nucléotides (N) sont ajoutés au hasard par la déoxynucléotidyl transférase terminale (TdT). Le terme de "non-templated" signifie qu'il n'y a pas d'appariement base à base sur un segment d'ADN. La TdT n'est exprimée qu'à ce stade précoce de développement lymphoïde.

- les insertions "templated", où quelques nucléotides sont ajoutés au niveau des joints codants. Ces nucléotides sont appelés P en raison de la structure palindromique des séquences RSS et sont complémentaires de l'extrémité du joint codant à proximité de la séquence RSS.

Le réarrangement est dit **fonctionnel ou productif** s'il préserve un cadre ouvert de lecture sans codon stop. Dans le cas contraire, il est dit non fonctionnel, ce qui survient dans deux cas sur trois. La recombinaison V(D)J permet donc de générer un vaste répertoire d'immunoglobulines à partir d'un nombre restreint de gènes. En effet, grâce à la diversité combinatoire, et à la diversité jonctionnelle, il est possible pour un individu de générer jusqu'à 10^9 immunoglobulines différentes.

Ces recombinaisons sont associées au **phénomène d'exclusion allélique**: seul un des 2 chromosomes est autorisé à faire un réarrangement productif, produisant des cellules B qui ne portent qu'un seul type de récepteur à l'antigène avec 2 chaînes lourdes identiques et 2 chaînes légères identiques et produisent ainsi des anticorps d'une seule spécificité. Ainsi, ces immunoglobulines sont produites à partir d'un seul chromosome 14 et de l'un des deux chromosomes 2 ou 22. Au cours de la différenciation du lymphocyte, une première recombinaison est tentée sur l'un des deux chromosomes 14 pris au hasard. Si la recombinaison est réussie, c'est à dire qu'un chaîne lourde fonctionnelle peut être synthétisée, le réarrangement est dit productif. Le second chromosome 14 n'est alors pas recombiné et ne sera pas exprimé. Si au contraire, la tentative est un échec (réarrangement abortif), une nouvelle recombinaison est tentée sur l'autre chromosome 14. Lorsque le réarrangement productif d'une chaîne lourde est effectif, le même processus se reproduit avec les chromosomes codant pour les chaînes légères. Une des deux chromosomes 2 codant pour la chaîne légère kappa est sollicité en premier. En cas d'échec, il est fait appel au deuxième locus *IGK* sur l'autre chromosome 2, puis en cas d'échec le locus *IGL* sur l'un des deux chromosomes 22 est sollicité. Ceci explique qu'une même cellule n'exprime jamais à la fois une chaîne κ et une chaîne λ : c'est le **phénomène d'exclusion isotypique**. Le locus *IGH* non exprimé est donc soit non réarrangé, soit réarrangé de façon non fonctionnelle. Les locus *IGK* sont donc toujours réarrangés (de façon non fonctionnelle) quand le BCR possède une chaîne légère λ .

Suite à ces recombinaisons, le **lymphocyte pré-B** se caractérise par l'apparition à la membrane d'un pré-BCR (1 chaîne lourde μ et 1 pseudo chaîne légère formée par la liaison covalente des protéines $\lambda 5$ et VpreB (VpreB/ $\lambda 5$), figure 1), associée à un hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79a/CD79b) (Berry et al. 2011). L'expression de l'antigène CD20 débute à ce stade. Le préBCR joue un rôle critique dans le phénomène d'exclusion allélique puisque les signaux médiés par ce pré-BCR bloquent l'accessibilité des recombinases RAG sur le deuxième allèle de la chaîne lourde μ non recombinée, et les redirige vers le locus des chaînes légères κ pour initier les premières recombinaisons (LeBien 2000). Le réarrangement des chaînes légères est donc provoqué, aboutissant à la formation d'un **lymphocyte B immature** exprimant alors un BCR complet associant une chaîne lourde et une chaîne légère qui remplace la pseudo-chaîne légère, ce qui bloque les recombinaisons de l'autre allèle de chaîne légère.

Le stade suivant est le **lymphocyte B mature naïf**. Ces cellules produisent un long transcrit d'ARN couvrant les régions constantes des chaînes μ et des chaînes δ . Un épissage alternatif de cet ARN associe la région variable aux domaines constants de l'un ou l'autre isotype. Ces cellules immatures ou naïves co-expriment ainsi les deux types d'immunoglobuline (IgM et IgD) avec la même spécificité.

Ces cellules exprimant des Ig membranaires de faible affinité, sont qualifiées de naïves car elles n'ont jamais rencontré d'autre antigène que ceux du "soi". Les lymphocytes auto-réactifs possédant une spécificité contre des antigènes du "soi" sont éliminés par apoptose à ce stade. Seules les cellules non auto-réactives seront sélectionnées pour la poursuite de leur développement (Feuillard et Raphaël 2000). Le **phénomène d'édition du récepteur** peut aussi permettre d'éviter la production de cellules B auto-réactives, au niveau de la moelle osseuse ou plus tard au cours de leur développement dans les tissus lymphoïdes périphériques au niveau des centres germinatifs. Ce phénomène implique une nouvelle recombinaison VJ ou VDJ, sous l'influence des endonucléases RAG, le plus fréquemment au niveau des locus IGK et IGL, beaucoup plus rarement au niveau du locus *IGH*.

Le phénotype B évolue au cours de la lymphopoïèse, car plusieurs molécules vont apparaître à la surface des cellules au cours de leur différenciation (figure 4), parallèlement au développement de leur BCR.

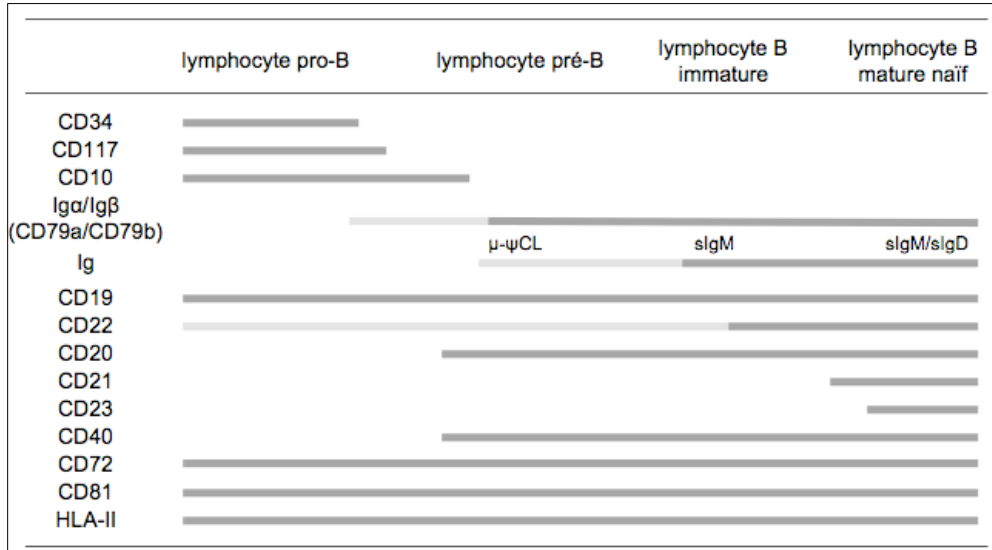


Figure 4: Evolution du phénotype B au cours de la lymphopoïèse (Morlon n.d.).

En gris clair: expression cytoplasmique. En gris foncé: expression membranaire.

2. L'immunopoièse (différenciation dépendante de l'antigène)

Il s'agit de la poursuite de la différenciation lymphoïde, dépendante de l'antigène et de la coopération avec les lymphocytes T, aboutissant à une maturation de la réponse immunitaire et à production d'anticorps neutralisants. Elle concerne les lymphocytes B issus de la moelle osseuse qui vont se différencier en lymphocytes B folliculaires, qui représentent 80% des cellules B de la rate adulte et possèdent la capacité de coloniser les ganglions lymphatiques. Parallèlement, une autre partie des lymphocytes B issus des lymphocytes B matures naïfs produits dans la moelle osseuse va se différencier en lymphocytes B de la zone marginale: ils seront impliqués dans les réponses humorales thymo-indépendantes (indépendantes des lymphocytes T). D'autres cellules B périphériques interviennent dans les réponses immunes T indépendantes, dont l'origine est controversée, mais importantes car constituant la première ligne de défense contre certains micro-organismes. Il s'agit des cellules B de la zone marginale folliculaire splénique, et les cellules B1 présentes notamment dans la cavité péritonéale, et des lymphocytes B régulateurs. En outre, des lymphocytes sont présents, de façon diffuse, dans presque tous les organes et tissus de l'organisme, à l'exception du système nerveux central.

L'immunopoièse s'effectue au sein des organes lymphoïdes périphériques ou secondaires, où s'organise la réponse immune au niveau locorégional (pour revue voir Feuillard et Raphaël 2000). Ils comprennent les ganglions lymphatiques, la rate, les amygdales, le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissue*), et le système lymphoïde cutané. La réponse immune B dépendante des lymphocytes T et de l'antigène est un processus compartimenté. Les territoires anatomiquement identifiés au sein des organes lymphoïdes secondaires sont les follicules primaires, les follicules secondaires et la zone marginale.

Les follicules primaires correspondent à un agrégat de lymphocytes B IgD+ IgM+ et de cellules folliculaires dendritiques, qui captent les complexes immuns et les exposent aux récepteurs de d'antigène (BCR) des lymphocytes B (Feuillard et Raphaël 2000).

Les follicules secondaires dérivent des follicules primaires, et sont le témoin d'une réponse immune B secondaire. Ils sont formés d'un centre germinatif et d'une couronne folliculaire (ou zone du manteau) contenant des lymphocytes B IgD+ IgM+, vestige du follicule primaire. Le centre germinatif est un carrefour décisionnel clé dans le devenir d'un lymphocyte B puisque sa vie ou sa mort sont décidés à ce niveau, selon l'affinité de l'immunoglobuline qu'il fabrique et la fonctionnalité de son BCR. Il est formé d'une zone sombre contenant des centroblastes (grandes cellules à noyaux non clivés), siège de la prolifération lymphoïde intense, des mutations somatiques et de la commutation isotypique; et d'une zone claire contenant des centrocytes (petites cellules à noyaux clivés, qui ne prolifèrent plus) et de cellules dendritiques; siège de la sélection des lymphocytes B par l'antigène et de leur différenciation en lymphocyte B mémoire ou en plasmocytes (pour revue voir Klein et Dalla-Favera 2008).

La réponse immune B T-dépendante est compartimentée en 3 phases: la phase "pré-centre germinatif", la phase du centre germinatif correspondant au passage dans le centre germinatif et une phase "post centre germinatif". Ces trois phases correspondent à des compartiments lymphocytaires différents qui peuvent être caractérisés sur le plan immunophénotypique et moléculaire (Feuillard et Raphaël 2000).

a. La phase pré-centre germinatif

Rencontre avec l'antigène et pré-activation du BCR

Les lymphocytes B naïfs produits par la moelle osseuse circulent puis rejoignent les organes lymphoïdes secondaires jusqu'à rencontrer l'antigène complémentaire de leur Ig de surface. Cette rencontre peut avoir lieu soit dans les tissus soit au niveau même d'un organe lymphoïde périphérique, l'antigène étant porté par une CPA. Cette rencontre, suite au pontage d'au moins deux BCR facilité par la présence d'épitopes répétés sur l'antigène, induit l'activation du BCR via les molécules CD79a et CD79b qui déclenche une cascade de transduction, aboutissant à une action positive sur la prolifération et la survie de la cellule B. Cette activation implique une phosphorylation sur les résidus tyrosine présents sur les motifs ITAMs (figure 1) de la portion intra-cytoplasmique des molécules CD79 par des kinases associées au BCR (Blk, Fyn, Lyn...). Cette activation dépendante du BCR est modulée par des signaux indépendants du BCR liés à l'environnement (cytokines, complément, molécules d'adhésion...), qui permettent de moduler la signalisation du BCR vers la survie, l'apoptose, l'activation, la prolifération ou la différenciation.

Rencontre avec le lymphocyte T CD4 dans la zone interfolliculaire

Au sein de l'organe lymphoïde le plus proche, l'activation du lymphocytes B pourra être complète grâce à la coopération avec un lymphocytes T CD4 spécifique du même antigène et avec les cellules folliculaires dendritiques présentatrices de l'antigène, au niveau de la zone T interfolliculaire (Feuillard et Raphaël 2000). Cette coopération est médiée par plusieurs couples ligand-récepteur (figure 5) comprenant le CD40 exprimé par le lymphocyte B et son ligand CD154 exprimé par le lymphocyte T. Le lymphocyte B joue le rôle d'une cellule présentatrice d'antigène pour le lymphocyte T préalablement activé par une cellule folliculaire dendritique au sein de la zone T (Klein et Dalla-Favera 2008). Au cours de cette interaction, le lymphocyte B reçoit de la part du lymphocyte T des signaux nécessaires à sa prolifération et sa maturation, comme de l'IL-2 et de l'IL-4. L'activation du lymphocyte induit une prolifération intense, formant des foyers de cellules dites "B-blastiques".

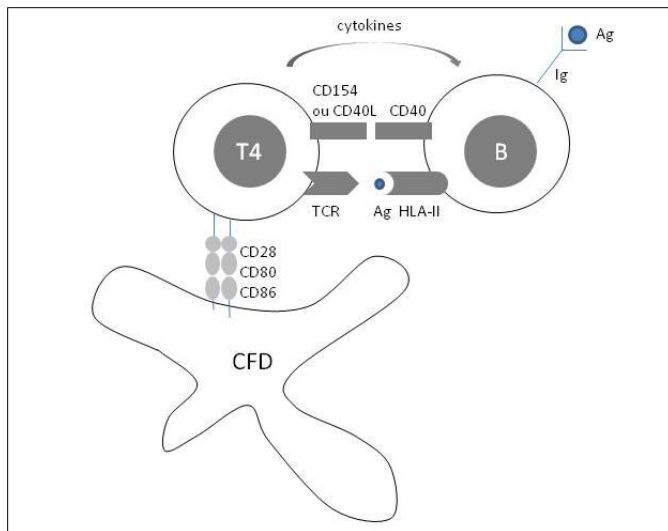


Figure 5: Activation de la cellule B par l'interaction avec un lymphocyte T CD4 et la cellule présentatrice d'antigène au niveau de la zone T interfolliculaire.

Ag: antigène, CFD: cellule folliculaire dendritique, HLA: human leucocyte antigen, Ig: immunoglobuline, TCR: T-cell récepteur.

Induction d'une réponse anticorps "primaire"

Quelques lymphocytes B blastiques vont migrer vers la zone médullaire du ganglion et se différencier rapidement en plasmocytes de courte durée de vie (Feuillard et Raphaël 2000). Cette différenciation dépendante de l'antigène entraîne une modification de la maturation des ARN messagers des chaînes lourdes, qui se traduit par la disparition des Ig membranaires et la sécrétion d'IgM. Cette IgM, caractéristique de la réponse immune primaire est une IgM de faible affinité pour l'antigène (car les gènes des immunoglobulines de ces plasmocytes n'ont pas subi l'hypermutation somatique, qui prendra place lors de la phase du centre germinatif). De plus cette production rapide d'anticorps permet de générer des complexes immuns circulants qui vont être captés au niveau des organes lymphoïdes secondaires par les cellules folliculaires dendritiques.

Les autres lymphocytes B-blastiques migreront au sein des follicules primaires adjacents et constitueront le peuplement fondateur des centres germinatifs, structure composée de cellules B IgM+ IgD+ au sein d'un réseau de cellules dendritiques folliculaires (Klein et Dalla-Favera 2008).

b. Phase de la réaction du centre germinatif

La réaction du centre germinatif va aboutir à la maturation d'affinité de l'immunoglobuline, avec pour but la production d'anticorps de haute affinité pour l'antigène. Le centre germinatif est la structure formée dans les organes lymphoïdes secondaires quelques jours après l'activation par l'antigène et dans laquelle le lymphocyte activé va

la majorité des autres cellules de l'organisme. Ce programme comporte d'une surexpression importante de gènes associés à la prolifération comme B-cell lymphoma 6 (BCL6), interferon regulatory factor 8 (IRF8), paired box protein 5 (PAX5) et à la sous expression d'autres gènes notamment pro-apoptotiques comme B-cell lymphoma 2 (BCL2) (Klein et Dalla-Favera 2008).

Au stade de centroblaste, des mutations aléatoires des régions variables (segments VH et VL, et dans les introns adjacents) des gènes des immunoglobulines appelé "**hypermutation somatique**" va permettre de sélectionner positivement les clones lymphocytaires B présentant une immunoglobuline affine pour l'antigène, en accroissant considérablement la diversité du répertoire. Ces mutations somatiques sont associées à un arrêt transitoire de la transcription des gènes des immunoglobulines et il n'y a donc plus d'Ig de surface détectable. Ce mécanisme introduisant des mutations ponctuelles et plus rarement des insertions ou délétions à un taux très élevé (10^{-3} à 10^{-4} par division cellulaire) aboutit à une diversité supplémentaire à n'importe quel endroit de la région variable des gènes de chaînes lourdes et légères qui sont exprimés. Bien que reliées au hasard, ces mutations dues à la sélection par l'antigène vont s'accumuler préférentiellement au niveau des régions hypervariables (CDRs- Complementary Determining Regions) qui déterminent la complémentarité avec l'antigène. Ces mutations somatiques sont à l'origine de changements dans la structure du paratope. L'enzyme activation-induced cytidine deaminase (AID) s'exprime et constitue un élément clé du processus mutationnel. Son activité de déamination directe des cytidines (C->U) de l'ADN, ciblée sur les motifs RGYW et WRCY fréquents dans cette région du génome (Rogozin et Diaz 2004), favoriserait la formation de mésappariements nucléotidiques, qui entraîneraient une cascade d'évènements de réparation de l'ADN. Cela favoriserait alors la formation de cassures simple brin, et peut être double brin de l'ADN, qui seraient ensuite immédiatement réparées par des polymérases dépourvues de système de correction, avec incorporation nucléotidiques (Jardin et al. 2004).

Le gène *B-cell lymphoma 6 (BCL6)*, identifié de par sa translocation dans le lymphome B diffus à grandes cellules (Ye et al. 1993), est indispensable à la genèse des centre germinatifs. La protéine BCL6 est exprimée spécifiquement par les lymphocytes B du centre germinatif ainsi que par les lymphocytes T CD4 des centres germinatifs (Ye et al. 1997). BCL6 est un répresseur transcriptionnel qui agit en recrutant des complexes protéiques co-répresseurs afin de réprimer l'expression de multiples gènes cibles. Ainsi, il inhibe les gènes impliqués dans l'activation de la cellule B (CD69, STAT1, CD80), réprime les gènes impliqués dans la régulation négative du cycle cellulaire (p53, ATR) (Klein et Dalla-Favera 2008). Une autre fonction majeure de BCL6 est d'inhiber la différenciation plasmocytaire des cellules B du centre germinatif, en réprimant BLIMP1 qui lui est un facteur de transcription indispensable à la différenciation plasmocytaire, ainsi que la différenciation en cellule B mémoire. *BCL6* subit le même type de processus de mutations aléatoires de celui des immunoglobulines au cours du passage de la cellule B dans le centre germinatif (Pasqualucci et al. 1998).

Les centroblastes se différencient ensuite en centrocytes qui ne prolifèrent plus, ils migrent et constituent avec les CFD la zone claire du centre germinatif. Les centrocytes peuvent réentrer dans la zone sombre et redevenir centroblastes afin de proliférer. Un gradient de chimiokine, différent entre la zone sombre et claire, probablement établi par les cellules stromales présentes dans cette zone, notamment CXCL12 et CXCR13, pourrait expliquer les phases prolifératives différentes entre centroblastes et centrocytes (Klein et Dalla-Favera 2008). De même, *BCL6* ne doit plus être surexprimé à ce stade. Des signaux médiés le BCR activé par l'antigène, conduisent à la dégradation de la protéine BCL6 dans le protéasome. De plus, la signalisation médiée par CD40, donc liée aux lymphocytes T auxiliaires et les cellules folliculaires dendritiques, réprime l'expression de *BCL6* du fait de l'activation de NFκB et donc de l'interféron regulatory factor 4 (IRF4 ou multiple myeloma antigen 1 MUM1) (Klein et Dalla-Favera 2008).

Les centrocytes sont destinés à mourir par apoptose à moins qu'ils ne soient sauvés par la rencontre avec l'antigène. En effet, les centrocytes sont testés pour leur capacité à lier l'antigène, dans la zone claire du centre germinatif, par l'intermédiaire des CFD qui exposent pendant plusieurs mois l'antigène sous forme de complexes immuns rendant possible son accès aux centrocytes. La stimulation du BCR, couplée aux signaux de co-stimulation transmis par les cellules T par l'intermédiaire du signal CD40/CD154 (ou CD40-ligand), fournit des signaux de survie à la cellule B qui va alors poursuivre sa maturation. A l'inverse, l'échec de la liaison du BCR à l'antigène induit la mort de la cellule B suite à l'expression de CD95 (fas) dont la liaison fas-ligand induit l'apoptose. L'absence d'expression par les lymphocytes B du centre germinatif de la protéine anti-apoptotique BCL2, et l'expression de nombreux autres facteurs pro-apoptotiques permet d'accomplir la mort programmée par apoptose de toutes les cellules qui ne sont pas sélectionnées. Pour rares les centrocytes ayant subi cette sélection positive, le signal CD40/CD154 contribue à induire **la commutation isotypique (*switch*)** des immunoglobulines. Si l'interaction lymphocyte T-cellule folliculaire dendritique est indispensable à la survenue de la commutation de classe du fait de l'interaction CD40/CD154, d'autres récepteurs de surface sont impliqués dans la transduction du signal comme inducible T-cell co-stimulator (ICOS), transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin-ligand (TACI) et B-cell activating factor receptor (BAFFR), ainsi que le facteur de transcription IRF4 (Klein et Dalla-Favera 2008). Ce *switch* aboutit à la production par la cellule B d'une immunoglobuline d'isotype secondaire (IgA, IgG ou IgE). Des recombinaisons somatiques au niveau des séquences S (*Switch*) qui précèdent les gènes fonctionnels CH de chacune des chaînes lourdes, permettent à une cellule B mature de produire successivement différentes chaînes lourdes, associant le même gène réarrangé VH-DH-JH à d'autres exons de régions constantes ("gènes CH") comme C μ et C δ puis C γ ou C α ou C ϵ (IgM et IgD puis IgG ou IgA ou IgE) (Küppers et Dalla-Favera 2001). Chaque séquence S (*Switch*) est elle-même précédée d'un exon I et d'un promoteur, sensible à des cytokines et activateurs qui déclenchent le switch (Zhang et al. 2010). Chaque gène CH en dehors de C δ est précédé par une longue séquence répétée riche en GC (séquence switch), pouvant aller jusqu'à 12 kb. L'enzyme AID est indispensable à cette étape et permet son initiation en

introduisant des lésions au niveau des séquences S (Muramatsu et al. 2000). Le phénomène de commutation isotypique induit des cassures doubles brin dans la région S en amont du gène $C\mu$ (région "donneuse"), et dans la région S ("région acceptrice") en amont d'un autre gène CH, cassures qui sont ensuite reliées bout à bout. Le mécanisme exact de recombinaison n'est pas connu, mais la réparation par le système de jonction d'extrémités non homologues est indispensable (Klein et Dalla-Favera 2008). Par conséquent, au plan génétique, cette recombinaison implique au minimum la délétion du locus $C\mu$ du gène des immunoglobulines (Feuillard et Raphaël 2000; Zhang et al. 2010), figure 6. En plaçant un autre gène CH en aval de la séquence VHDHJH fonctionnelle, la cellule B peut alors exprimer une immunoglobuline porteuse d'une région constante différente (par exemple, une $C\gamma$ pour une IgG). La classe d'immunoglobuline exprimée secondairement au switch pourrait être déterminée par l'environnement cytokinique et des signaux de co-stimulation (Edry et Melamed 2007; Klein et Dalla-Favera 2008). Si la spécificité antigénique des immunoglobulines est déterminée par les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères, les fonctions effectrices, en revanche, dépendent des régions constantes et varient selon les isotypes.

La signature moléculaire d'une cellule B du centre germinatif est donc l'existence de mutations somatiques du gène des immunoglobulines et du gène *BCL6*, et l'expression de la protéine BCL6. En revanche, le même génotype associé à l'absence d'expression de la protéine BCL6 suggère une cellule post centre germinatif, qui peut être conforté par la mise en évidence de la délétion du locus $C\mu$, témoin de la commutation isotypique (Feuillard et Raphaël 2000). Des études chez la souris montrent que cette délétion pourrait être parfois uniquement hétérozygote sur l'allèle fonctionnel (ainsi la cellule exprime un isotype secondaire) ou homozygote (Radbruch et Sablitzky 1983). En revanche, des travaux effectués sur des lymphocytes B non naïfs IgM- IgD- exprimant IgA1, ou sur des cellules B exprimant IgG1 chez l'homme sain, identifient une délétion des gènes CH intermédiaires (dont $C\mu$), sur les 2 allèles (l'allèle fonctionnel et l'allèle non fonctionnel) (Radbruch et al. 1986; Irsch et al. 1994). On considère que contrairement au réarrangement VH-DH-JH qui n'est fonctionnel que sur un allèle, le phénomène de switch est le plus souvent présent sur les 2 allèles (Küppers et Dalla-Favera 2001).

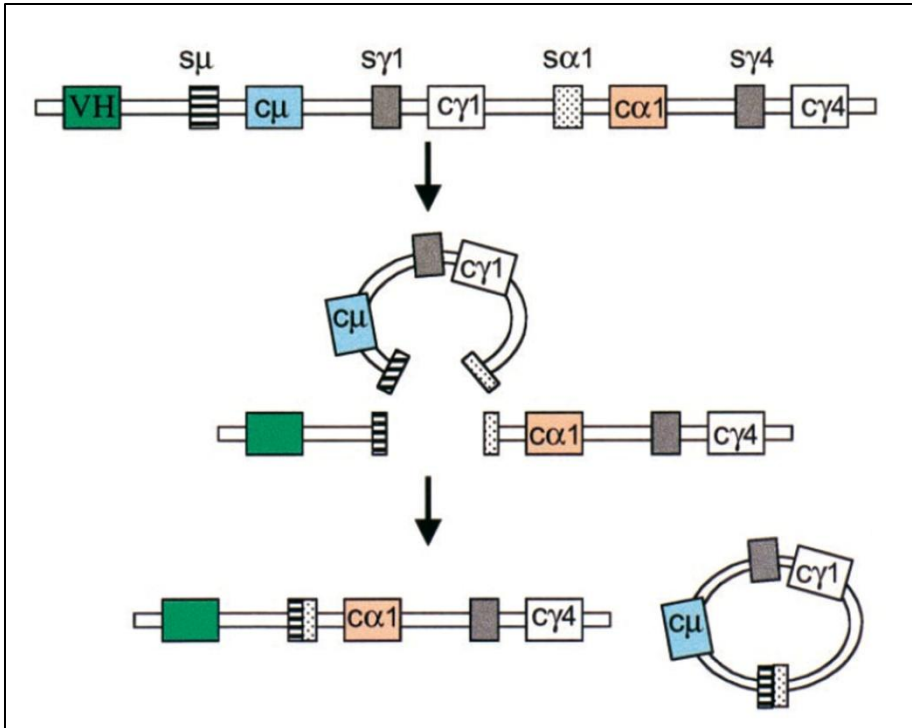


Figure 7: Recombinaison à l'origine du *switch* isotypique ou commutation de classe (Kuppers et Dalla-Favera, *Oncogene*, 2001). La commutation de classe est consécutive à la recombinaison entre les régions de switch (S) situés en amont de 2 gènes de chaînes constantes avec délétion de l'ADN intermédiaire sous forme d'ADN circulaire (contenant le locus C μ au minimum). Cette recombinaison est initiée par l'enzyme activation-induced cytidine deaminase (AID), des cassures double brin sont provoquées au niveau des régions S et sont ensuite réparées. Par exemple ici: recombinaison entre la région de switch S μ et S α , à l'origine de la production d'une immunoglobuline type IgA.

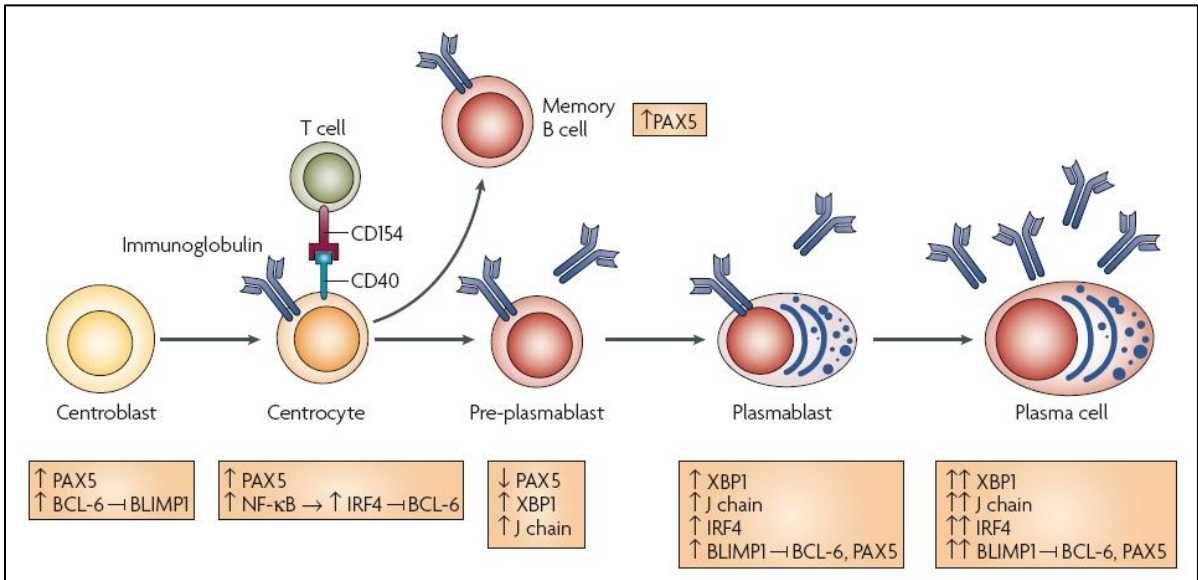


Figure 8: Fin du programme du centre germinatif et développement post centre germinatif (Klein et Dalla-Favera, *Nature Rev Immunol*, 2008). BCL6: B-cell lymphoma 6, BLIMP1: B-lymphocyte-induced maturation protein 1, IRF4: interferon regulatory factor 4, PAX5: paired box protein 5, NFκB: nuclear factor Kappa B, XBP1: X-box binding protein 1.

a. Phase post centre-germinatif: différenciation en lymphocyte B mémoire ou en plasmocyte

Après la sélection au niveau du centre germinatif des clones de haute affinité pour l'antigène, les cellules B vont pouvoir se différencier soit en lymphocytes B mémoire soit en plasmoblastes. Les signaux qui induisent la différenciation vers le plasmocyte ou vers le lymphocyte B mémoire ne sont pas bien connus. Cependant, l'expression ou la répression de plusieurs facteurs de transcription ont été identifiés comme indispensables à la différenciation plasmocytaire comme la régulation négative de BCL6 et de PAX5, ou l'expression de l'IRF4/MUM1 et de B-lymphocyte-induced maturation protein 1 (BLIMP1) (figure 8), aboutissant à la formation d'un "pré-plasmablaste" sécrétant de faibles quantités d'anticorps (Shaffer et al. 2002). Parmi les facteurs de transcription permettant la différenciation d'un centrocyte en une cellule B mémoire, on peut citer le facteur PAX5 (figure 8) (Klein et Dalla-Favera 2008).

Les lymphocytes B mémoire s'accumulent dans la zone marginale, puis quittent le centre germinatif pour la circulation et se dirigent vers les tissus périphériques et les zones d'inflammation. Ils peuvent se différencier en plasmocytes synthétisant immédiatement une Ig de haute affinité lors d'une stimulation antigénique ultérieure. Ils peuvent aussi retourner dans le centre germinatif subir une nouvelle sélection dans le but d'élargir le répertoire de immunoglobulines et devenir des plasmocytes, soit rentrer dans la circulation pour permettre une réponse immunitaire rapide lors d'une deuxième rencontre avec l'antigène. Il existe des cellules B IgM+ IgD+ porteuses d'hypermutations somatiques du gène des immunoglobulines, mais n'ayant pas effectué la commutation isotypique, correspondant à des cellules B mémoire (Klein et al. 1998). La commutation isotypique n'est donc pas obligatoire au niveau du centre germinatif. L'expression du marqueur CD27, exprimé par les lymphocytes B mémoire, pourrait différencier les cellules B pré-centre germinatif des cellules B mémoire (Klein et al. 1998) (figure 9).

Les plasmoblastes prolifèrent intensément et vont ensuite rejoindre la moelle osseuse ou la lamina propria de l'intestin pour y terminer leur différenciation en plasmocyte marquée par l'acquisition des marqueurs CD38 et CD138. Le début de la différenciation plasmocytaire est marqué par l'expression indispensable d'IRF4/MUM1, induisant alors l'expression de BLIMP1 qui réprime alors l'expression de BCL6, événements qui promeuvent la différenciation terminale plasmocytaire, l'expression de PAX5 et la sécrétion d'immunoglobuline (Klein et al. 2006).

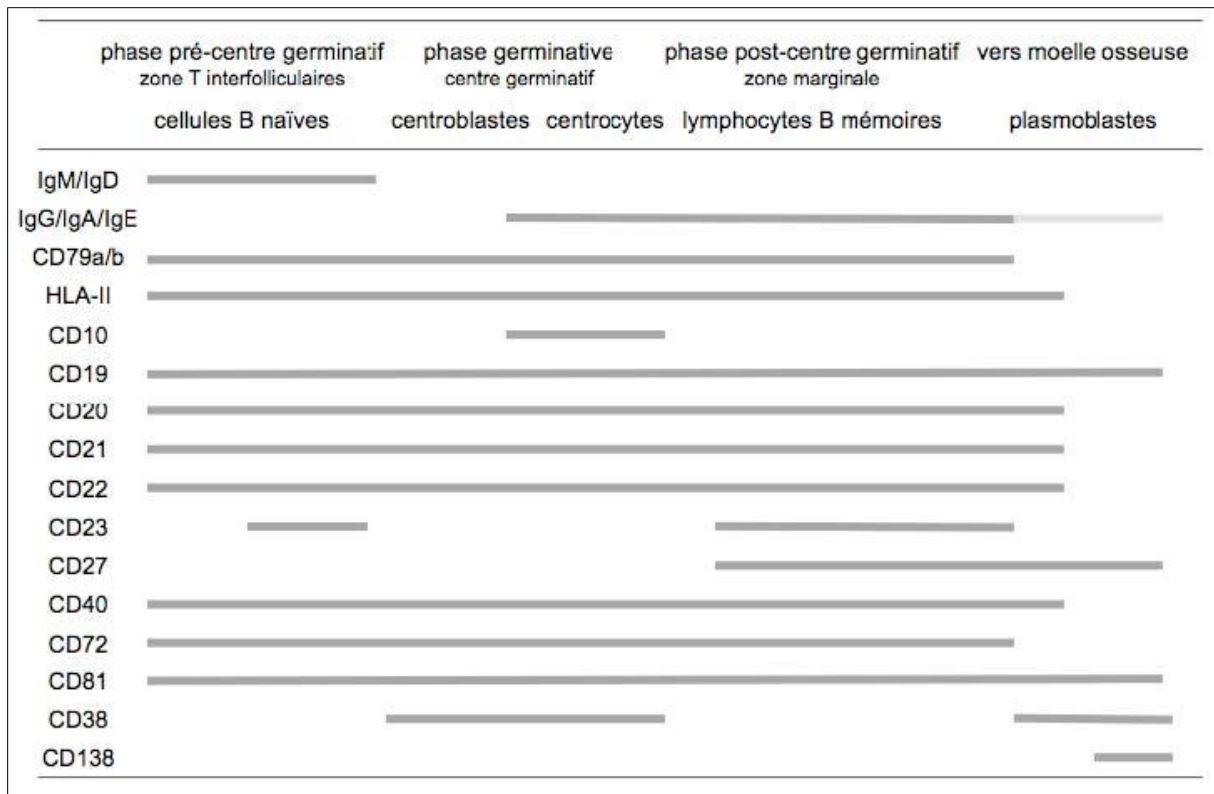


Figure 9: Evolution du phénotype B au cours de l'immunopoïèse (Morlon L). En gris clair: expression cytoplasmique, en gris foncé: expression membranaire.

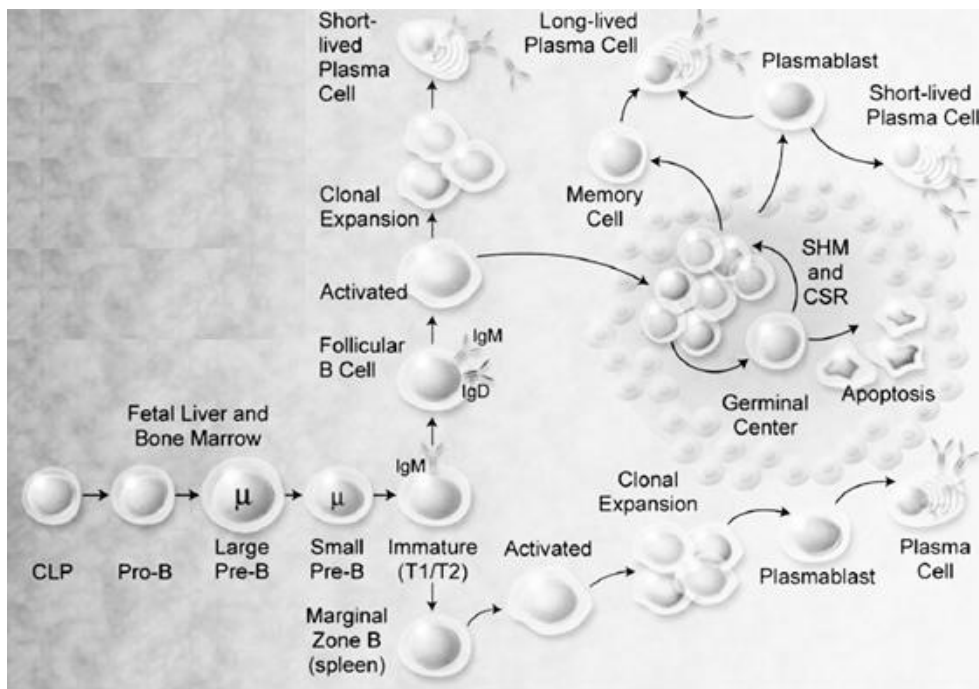


Figure 10: Développement du lymphocyte B (d'après LeBien TW et Tedder TF, Blood, 2008). CLP: progéniteur lymphoïde commun; SHM: somatic hypermutation (hypermutation somatique); CSR: class switch recombinaison (commutation isotypique).

3. Voies alternatives à la formation des centre germinatifs

Les cellules B des zones extrafolliculaires et présentes dans les organes lymphoïdes secondaires sont capables de fournir une réponse à l'antigène et de proliférer, comme par exemple les lymphocytes B de la zone marginale splénique. La rate a un rôle important de défense contre certains antigènes, et peut mettre en œuvre une réaction rapide contre des structures de type polysaccharide ou des bactéries encapsulées. Ces types d'antigènes sont nommés antigènes T-indépendants de type 2 (TI-2), sont capables de stimuler les lymphocytes B en l'absence de lymphocytes T auxiliaires (Walsh et Rosenquist 2005). Les lymphocytes B de la zone marginale splénique impliquées dans ces réponses sont majoritairement de type "mémoire", avec notamment une hypermutation somatique de leur gène *IGH*.

Les cellules B mémoire circulantes, caractérisées par le marqueur CD27, comportent chez l'homme 3 sous-types: les cellules ayant accompli le *switch*, une proportion exprimant IgM et IgD, et une partie exprimant seulement IgD (Weller et al. 2004). Ces cellules ont longtemps été considérées come post centre germinatif, car elles sont porteuses de l'hypermutation somatique (Klein et al. 1998). Cependant, le même type de lymphocytes, toujours porteurs d'hypermutations somatiques, a pu être observé chez des patients porteurs du syndrome hyperIgM lié à l'X, caractérisés par un défaut du gène CD40 ligand, et l'impossibilité de former des centres germinatifs et d'accomplir le *switch* (Walsh et Rosenquist 2005). Weller et al ont démontré que ces lymphocytes circulant IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ correspondaient à la contrepartie circulantes des lymphocytes B de la zone marginale splénique (IgM^{fort} IgD^{faible} CD21⁺ CD23⁻ CD1⁺) qui expriment les mêmes marqueurs, et que l'acquisition des hypermutations somatiques du gène *IGH* se faisait avant leur exposition à l'antigène et la réaction aux antigènes de type TI-2 (Weller et al. 2004). La rate posséderait donc un répertoire pré-diversifié des lymphocytes B de "type mémoire", ayant muté leur *IGH*, afin de permettre une réponse rapide aux agressions. L'origine et le lieu de la survenue de ces mutations, leur dépendance à AID sont toujours discutées (Weller et al. 2005).

B. Les lymphomes B

Les maladies lymphoprolifératives B sont des proliférations malignes clonales de cellules B à différents stades de leur développement. Ces proliférations anormales sont à l'origine de lymphomes le plus souvent caractérisés par la cellule d'origine.

1. Classification des lymphomes

La classification actuelle des lymphomes définie par l'OMS est un recensement d'entités définies selon des paramètres cliniques, histologiques morphologiques, immunophénotypiques, et cytogénétiques, géniques ou moléculaires (Delsol 2010). Ils sont intégrés au sein de la classification de l'OMS 2008 des tumeurs du tissu hématopoïétique et lymphoïde (tableau 1), qui différencie lymphomes Hodgkiniens et non-Hodgkiniens, abandonnant le terme de maladie de Hodgkin (Swerdlow 2008). Les lymphomes non-Hodgkiniens sont développés à partir des cellules B, T ou Natural Killer (NK). En Europe et en Amérique du Nord, les lymphomes B sont de loin les plus fréquents et représentent 80-90% des lymphomes (Delsol 2010).

Les lymphomes cutanés sont des proliférations lymphoïdes clonales malignes primitivement localisées à la peau, de phénotype lymphocytaire T ou B, sans signe d'atteinte extra-cutanée au moment du diagnostic. Ils sont différents des lymphomes cutanés secondaires, qui surviennent soit dans un contexte connu de lymphome ganglionnaire ou extra-nodal non cutané de même type histologique, soit le bilan d'extension se révèle positif au moment du diagnostic de la lésion cutanée. Même si leur incidence semble en augmentation dans les rares études épidémiologiques spécifiques disponibles (Bradford et al. 2009, registre aquitain des lymphomes cutanés), les LCP restent une pathologie rare avec une incidence annuelle estimée à 1/100000, répartis en lymphomes cutanés T (70 à 75%) et lymphomes cutanés B (25 à 30%). Les lymphomes cutanés B sont moins fréquents que les lymphomes cutanés T, ils représentent 25% de l'ensemble des lymphomes cutanés, contrairement aux lymphomes ganglionnaires où le phénotype B est le plus fréquent.

Après la première classification anatomo-clinique de l'"European Organisation for Research and Treatment of Cancer" (EORTC) en 1997, et un travail consensuel la WHO en 2005 ayant abouti à la classification WHO-EORTC de 2005 (Willemze et al. 2005), les lymphomes cutanés primitifs (LCP) sont partiellement intégrés au sein de la classification des tumeurs du tissu hématopoïétique et lymphoïde WHO 2008 (Swerdlow 2008)(tableau 1). Cependant, la classification WHO-EORTC reste d'actualité pour la compréhension des lymphomes cutanés car elle distingue l'ensemble des entités anatomocliniques en tenant compte de l'origine B ou T lymphocytaire et des critères d'agressivité des différentes entités (tableau 2). D'autres LCP très rares sont développés à partir des cellules NK (Natural Killer) ou de leurs précurseurs.

Les LCP sont des entités distinctes qui, malgré des similarités anatomopathologiques avec leurs équivalents ganglionnaires, ont un comportement clinique différent et nécessitent une prise en charge adaptée à leur pronostic, distincte de la prise en charge des lymphomes systémiques. Leur diagnostic nécessite une confrontation pluridisciplinaire des données cliniques, histologiques, immunophénotypiques et éventuellement cytogénétiques et moléculaires (Beylot-Barry et al. 2010; Grange et al. 2010). Qu'il s'agisse d'une prolifération B ou T lymphocytaire, il est parfois difficile de différencier une hyperplasie lymphoïde bénigne réactionnelle d'un authentique LCP, de différencier un LCP par rapport à un autre, ou de différencier un LCP d'un lymphome cutané secondaire. Les informations cliniques et évolutives, la qualité du prélèvement biopsique et sa fixation, et l'expérience de l'équipe sont autant d'éléments importants au diagnostic de LCP.

Syndromes myéloprolifératifs	Néoplasies issues des cellules T matures et NK Leucémie T polylmphocytaire Leucémie à grands lymphocytes granuleux Leucémie agressive à cellules NK Lymphoprolifération systémique T EBV+ de l'enfant Lymphome hydroa-vacciniforme-like Leucémie/Lymphome T de l'adulte Lymphome T/NK extranodal Lymphome T associé aux entéropathies Lymphome T hépatosplénique <i>Lymphome T sous cutané type panniculite</i> <i>Mycosis fungoides</i> <i>Syndrome de Sézary</i> <i>Lymphoproliférations cutanées CD30</i> <i>Papulose lymphomatoïde</i> <i>Lymphome anaplasique à GC cutané</i> <i>Lymphome T γ / δ cutané</i> <i>Lymphome T cutané agressif épidermotrope CD8+ (provisoire)</i> <i>Lymphome T à petites / moyennes cellules CD4+ (provisoire)</i> Lymphome T périphérique, NOS Lymphome T angioimmunoblastique Lymphome anaplasique à GC ALK- (provisoire) Lymphome anaplasique à GC ALK+
Néoplasies myéloïdes et lymphoïdes avec éosinophilie et anomalies de PDGFRα, PDGFRβ ou FGFR1	
Néoplasies myélodysplasiques/myéloprolifératives	
Syndromes myélodysplasiques	
Leucémies aiguës myéloïdes et apparentés	
Leucémies aiguës d'origine ambiguë	
Néoplasies issues des précurseurs lymphoïdes Lymphomes/leucémies B lymphoblastique Lymphome/leucémie T lymphoblastique	
Néoplasies issues des cellules B matures Leucémie lymphoïde chronique/lymphome lymphocytaire Leucémie B prélymphocytaire Lymphome B de la zone marginale splénique Leucémie à tricholeucocytes Lymphome lymphoplasmocytaire Maladies des chaînes lourdes Myélome Plasmocytome solitaire des os Plasmocytome extra-osseux Lymphome du MALT extranodal Lymphome du MALT ganglionnaire Lymphome folliculaire <i>Lymphome folliculaire primitivement cutané</i> Lymphome du manteau Lymphomes B diffus à grandes cellules, NOS Lymphome à GC riche en cellules T/histiocytes LBDGC du système nerveux central <i>LBDGC primitivement cutané de type membre inférieur</i> LBDGC associé à l'inflammation chronique Granulomatose lymphomatoïde Lymphome B à GC du médiastin (thymus) Lymphome B à GC intravasculaire Lymphome B à GC ALK-positif Lymphome plasmablastique Lymphome B à GC HHV8 associé au Castleman Lymphome « primary effusion » Lymphome de Burkitt Lymphome B inclassable	Lymphomes Hodgkiniens Néoplasies issues des histiocytes et cellules dendritiques Lymphoproliférations post transplantation

Tableau 1 : classification OMS 2008 (Swerdlow, 2008). En gras et italique, les lymphomes cutanés individualisés par cette classification.

	Survie spécifique à 5 ans	Fréquence (%)	Comportement
Lymphomes cutanés T et NK (75% des LCP)			
Mycosis Fongoïdes	88%	44	indolent
MF variants et sous-types			
MF folliculotrope (avec ou sans mucine)	80%	4	indolent
Lymphome pagétoïde (Woringer-Kolopp)	100%	<1	indolent
Granulomatous slack skin (lymphome chalazodermique)	100%	<1	indolent
Syndrome de Sézary	24%	3	agressif
Leucémie / lymphome T de l'adulte			
Lymphoproliférations cutanées CD30 +			
Lymphome anaplasique à grandes cellules CD30+	95%	8	indolent
Papulose lymphomatoïde	100%	12	indolent
Lymphome T sous-cutané type panniculite	82%	1	indolent
Lymphome T/NK extra-nodal, type nasal		<1	agressif
LCT périphérique, type indéterminé			
<i>Lymphome T CD8+ épidermotrope agressif</i>	18%	<1	agressif
Lymphome T cutané γ/δ +	-	<1	agressif
<i>Lymphome T à petites et moyennes cellules CD4+</i>	75%	2	agressif
Lymphomes cutanés B (25% des LCP)			
Lymphome B cutané de la zone marginale (LCP-ZM)	99%	7	indolent
Lymphome B cutané des centres folliculaires (LCP-CF)	95%	11	indolent
Lymphome B à grandes cellules type membre inférieur (LCBGC-MI)	55%	4	intermédiaire
Lymphome B diffus à grandes cellules, autre	50%	<1	intermédiaire
Lymphome B intravasculaire à grandes cellules	65%	<1	intermédiaire
Néoplasie issue des précurseurs hématologiques			
Hématodermie CD4+/CD56+	-		agressif

Tableau 2: classification des lymphomes cutanés (d'après Willemze et al, 2005 et Swerdlow, 2008). *En italique, entités « provisoires » dans la classification WHO 2008*

2. Mécanismes pouvant être à l'origine des anomalies moléculaires dans les lymphomes

Différents mécanismes génétiques peuvent être responsables de la transformation des cellules B et former un lymphome. La survie anormale des lymphocytes B peut être liée à différentes altérations génétiques comme des translocations, des mutations, des délétions ou méthylation de promoteurs entraînant la perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeur, des amplifications... De plus la dérégulation de certaines régions codant pour des microARN (miR), et le microenvironnement de la cellule tumorale peuvent aussi participer à l'oncogenèse des lymphomes.

L'enzyme activation-induced cytidine deaminase (AID) est nécessaire aux phénomènes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique lors de la différenciation lymphoïde normale des cellules B dans le centre germinatif. A un stade plus précoce l'action des recombinases RAG est indispensable au réarrangement V(D)J. Ces modifications génétiques sont essentielles à une réponse immunitaire humorale normale, mais peuvent aussi être à l'origine de dommages comme des mutations et des translocations.

Les translocations sont favorisées par les mécanismes génétiques de recombinaison à nécessaires au développement et à la différenciation des lymphocytes B. Les translocations chromosomiques associées aux lymphomes non Hodgkiniens sont essentiellement des translocations réciproques et équilibrées, causant la dérégulation transcriptionnelle d'un gène cible, par dérégulation du promoteur (Schneider et al. 2011). La création d'un gène de fusion est beaucoup plus rare, comme NPM-ALK (nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase) dans les lymphomes T anaplasiques systémiques (Delsol 2010). Ces translocations impliquent fréquemment mais non exclusivement le locus des gènes des immunoglobulines (*IGH*, *IGK*, *IGL*), le plus souvent *IGH*. L'étude des points de cassures peut suggérer que la translocation est survenue lors du réarrangement V(D)J, de l'hypermutation somatique ou lors de la commutation de classe (Küppers et Dalla-Favera 2001). En effet, lors de la recombinaison entre les segments V, D et J, les enzymes RAG1 et RAG2 induisent les cassures doubles-brin nécessaires à cette recombinaison, en ciblant les motifs RSS. Ces cassures sont normalement réparées mais peuvent potentiellement, si elles persistent, expliquer l'apparition d'anomalies structurales comme une translocation. Ainsi, les translocations t(11;14) (*BCL1/IGH*) et la t(14;18) (*BCL2/IGH*) sont connues pour se produire au cours des recombinaisons V(D)J. La t(14;18) qui est détectée dans la plupart des lymphomes folliculaires et une fraction des lymphomes B diffus à grandes cellules, implique les gènes *BCL2* et *IGH*, aboutissant à la dérégulation de *BCL2* conférant ainsi un avantage de survie aux cellules. L'étude des points de cassure montre qu'ils se situent à proximité des motifs RSS ce qui suggère qu'elle soit apparue au cours de la recombinaison V(D)J. Des translocations peuvent aussi être induites lors de l'hypermutation somatique, ou lors de la commutation isotypique (Küppers et Dalla-Favera 2001).

Lors de la réaction du centre germinatif, le phénomène d'hypermutation somatique et de commutation isotypique, nécessitant la présence et l'action de l'enzyme AID, peuvent donc aussi être à l'origine de dommages (Lenz et Staudt 2010). L'hypermutation somatique contribue à la lymphomagenèse en causant non seulement des translocations chromosomiques car elle s'accompagne de cassures de l'ADN, mais également en ciblant les mutations sur des gènes ne codant pas pour les Ig: on parle d'hypermutation somatique aberrante qui peut concerner des proto-oncogènes (Klein et Dalla-Favera 2008). Les gènes *IGH*, *IGK*, *IGL* sont ciblés par cette hypermutation somatique physiologique, ainsi que *BCL6* et *CD95* (fas). D'autres gènes subissent le même type de processus d'hypermutation somatique (*PAX-5*, *c-MYC*, *PIM-1*, et *RHOH\TTF*), mais uniquement dans les lymphomes: ils restent en configuration sauvage dans les lymphocytes B normaux (Pasqualucci et al. 2001).

Lors de la commutation de classe des Ig, on identifie également des translocations caractérisées par la présence de points de cassure dans les régions "switch" des régions constantes. Un exemple est la translocation t(8;14) impliquant c-MYC dans le lymphome de Burkitt (Küppers et Dalla-Favera 2001). La commutation isotypique est non seulement impliquée dans de nombreuses translocations réciproques mais pourrait aussi déréguler certains oncogènes par des événements d'insertion. Des séquences correspondant aux séquences switch ont été identifiées à proximité d'oncogènes (par exemple, cycline D1 dans un cas de myélome, contenant la séquence enhancer d'*IGH*, à l'origine de la surexpression de cycline D1) (Küppers et Dalla-Favera 2001).

D'autres mécanismes peuvent cependant conférer un avantage de survie à la cellules et ainsi contribuer à la lymphomagenèse: des mutations inactivatrices ou délétions de gènes suppresseurs de tumeurs (ex: p53), des amplifications génomiques (ex-c-REL ou BCL2), ou l'implication de virus comme l'Epstein -Barr qui est impliqué dans la pathogenèse du lymphome de Burkitt, dans la plupart des lymphomes post transplantations ou associés au SIDA, et dans une partie des lymphomes de Hodgkin. Les gènes régulant la conformation chromatinienne et donc l'expression ou la répression de la transcription des gènes, peuvent aussi être mutés.

Tous ces éléments suggèrent que ces processus physiologiques ont un rôle important dans la lymphomagenèse, de l'initiation à la progression tumorale, en créant des altérations "driver" de l'oncogenèse, ou parfois secondairement acquis lors de la progression tumorale, qualifiés de "passenger".

3. Les lymphomes cutanés B

Ils représentent 25% des lymphomes cutanés primitifs. Parmi les lymphomes cutanés B, 75% des cas sont de bon pronostic, considérés comme "indolents": il s'agit des lymphomes cutanés B de la zone marginale (LCP-ZM), et des lymphomes cutanés B primitifs des centre folliculaires (LCP-CF). Les 25% restants sont de pronostic "intermédiaire", dont la grande majorité sont représentés par le lymphome cutané B primitif diffus à grandes cellules de type jambe (LBDGC-TJ). Les autres types représentent moins de 5% des lymphomes cutanés B: le lymphome B cutané primitif à grandes cellules (autre) et le lymphome B à grandes cellules intravasculaire (Willemze et al. 2005; Grange et al. 2010).

a. Lymphome B cutané primitif de la zone marginale (LCP-ZM)

Les LCP-ZM représentent 25 à 30% des lymphomes cutanés B et 7% de l'ensemble des LCP. Ils ne sont pas identifiés à part dans la classification OMS 2008, mais font partie des lymphomes de la zone marginale "extra-nodaux". Cliniquement, il s'agit de papules ou de nodules érythémateux ou violacés, touchant préférentiellement le tronc (plus de 50% des cas) ou les membres notamment les membres supérieurs (Willemze et al. 2005; Suárez et al. 2013b). Les hommes sont plus souvent atteints (sex-ratio 2/1), d'âge moyen (âge médian 53 ans) (Senff et al. 2007). L'atteinte cutanée est multifocale, dans plus de la moitié des cas (Senff et al. 2008a). Une association avec la maladie de Lyme (*Borrelia burgdorferi*) a été rapportée dans quelques cas européens (Cerroni et al. 1997; Goodlad et al. 2000), non confirmée par d'autres (Goteri et al. 2007; Takino et al. 2008). L'hypothèse infectieuse dans cette pathologie est ainsi toujours discutée, par analogie aux autres lymphomes de la zone marginale extra-nodaux. En effet, une inflammation chronique liée à une infection pourrait engendrer une accumulation de tissu lymphoïde extra-nodale, et ainsi favoriser la survenue du lymphome (Swerdlow 2008). Par exemple, dans les lymphomes du MALT gastriques, une antibiothérapie éradiquant l'infection par *Helicobacter pylori* (Hp) est proposée devant la fréquence dans cette localisation de l'infection à Hp associée. De même, dans les lymphomes du MALT des annexes de l'œil, le rôle des infections par *Chlamydiae psittaci* est discuté (Ferreri et al. 2009).

L'analyse histologique de la biopsie cutanée montre un infiltrat d'architecture nodulaire à diffuse. Des centres germinatifs réactionnels peuvent être observés, mieux identifiés grâce aux marqueurs folliculaires dendritiques (CD21, CNA42), cernés et/ou colonisés par une population de cellules B de la zone marginale qui sont de taille petite à moyenne, avec des noyaux irréguliers, et un important cytoplasme pâle. Une différenciation plasmocytaire est possible, où des plasmocytes sont identifiés à la périphérie de l'infiltrat et dans le derme superficiel. L'infiltrat est composé de petites cellules B : des cellules de la zone marginale (type centrocytes), des cellules lymphoplasmocytoïdes, et des plasmocytes, mélangées avec quelques cellules centroblastiques ou de type immunoblastiques et des lymphocytes T réactionnels souvent nombreux. Un composant monocytoïde peut s'y ajouter

(Schreuder et al. 2005). Les cellules de la zone marginale sont de phénotype B lymphocytaire (CD20+, CD79a+, CD3-, CD5-). Elles expriment le BCL2 mais pas les marqueurs de différenciation des centres folliculaires (BCL6-, CD10-) contrairement à ce qui est observé en cas de follicule réactionnel (BCL6 et CD10 +, BCL2-). Lorsqu'ils sont présents, les plasmocytes (Syndecan/CD138+, IRF4/MUM1+) ont une expression cytoplasmique monotypique des chaînes légères des immunoglobulines (monotypie kappa ou lambda). Un réarrangement du gène *IGH* est retrouvé dans la majorité des cas mais peut aussi être présent dans les cas d'hyperplasie lymphoïde réactionnelle ou pseudolymphome. Le diagnostic différentiel se pose notamment avec une hyperplasie lymphoïde réactionnelle, parfois avec un LCP-CF où des follicules anormaux peuvent être colonisés par des cellules de la zone marginales normales.

Sur le plan moléculaire, les translocations associées aux lymphomes du MALT sont rarement observées dans le LCP-ZM (tableau 3). Dans les lymphomes du MALT ganglionnaires, la t(11;18)(q21;q21) mettant en jeu les gènes *API2* et *MALT1* est la plus spécifique, aussi observée dans 20 à 30% des cas des lymphomes du MALT gastriques, mais elle n'a pas été observée dans les LCP-MZ, de même que la t(1;14)(p22;q32) (Hallermann et al. 2004; Schreuder et al. 2005; de la Fouchardiere et al. 2006; Belaud-Rotureau et al. 2008). En revanche, la t(14;18)(q32;q21), translocation réciproque entre le gène *MALT* sur le chromosome 18 et le gène *IGH* sur le chromosome 14, observée dans des atteintes des annexes oculaires et des glandes salivaires, a été identifiée dans une faible proportion de cas avec morphologie monocytoïde (Streubel et al. 2003; Schreuder et al. 2005). De même, la t(3;14)(p14;q32) impliquant les gènes *FOXP1* et *IGH* peut être observée dans environ 10% des lymphomes du MALT extranodaux notamment cutanés (Streubel et al. 2005). Une variabilité géographique de l'incidence et des spécificités d'organe des translocations a été remarquée, suggérant le rôle de facteurs environnementaux comme les infections (Swerdlow 2008).

Le pronostic est bon, avec une survie spécifique et survie globale à 5 ans respectivement de 98% et 94%, et un risque d'évolution extra-cutanée rare touchant moins de 10% des patients (Senff et al. 2007). Un traitement local par radiothérapie (ou éventuellement chirurgie, injection intra-lésionnelles de corticoïdes, dermocorticoïdes...) est habituellement proposé dans les formes localisées, une monothérapie par anticorps monoclonal antiCD20 (RITUXIMAB) dans des formes plus diffuses (Senff et al. 2008b; Grange et al. 2010; Suárez et al. 2013a). Les récurrences cutanées sont extrêmement fréquentes, dans 50 à 60% des cas, et n'aggravent pas le pronostic (Suárez et al. 2013a). Aucun facteur pronostique clinique, histologique ou moléculaire n'est actuellement bien identifié.

b. LCP des centres folliculaires

Les LCP-CF représentent 55% des lymphomes cutanés B et 11% des LCP, ils représentent le type de lymphome cutané B le plus fréquent (Suárez et al. 2013b). Les

hommes sont plus fréquemment touchés (sex ratio de 1,8), d'âge médian de 58 ans (Senff et al. 2007). Ils sont classés à part dans la classification WHO 2008. Cliniquement, il s'agit de plaques infiltrées, nodules ou de tumeurs soit unique (41%), soit multiples locorégionales (43%), siégeant préférentiellement sur l'extrémité céphalique et le tronc, de couleur rosée à violacée. Certaines présentations cliniques peuvent être atypiques, notamment sur le visage: rosacée-like, lupus-like (Suárez et al. 2013b). Une atteinte généralisée est plus rarement observée, dans 16% des cas, sans modification du pronostic (Senff et al. 2007). Ces tumeurs peuvent être entourées notamment au niveau du tronc par des papules ou des plaques infiltrées érythémateuses, réalisant une présentation clinique typique anciennement appelée «lymphome ou réticulose de Crosti». Ces papules localisées un peu à distance de la lésion principale peuvent être très discrètes et poser problème lors de la mise en œuvre d'un traitement localisé.

Au plan anatomopathologique, on observe une prolifération lymphoïde d'architecture folliculaire, folliculaire à diffuse, ou diffuse, respectant habituellement le derme superficiel. Une répartition périannexielle ou périvasculaire de l'infiltrat est fréquente. Il est classiquement composé de cellules B de taille petite à moyenne, centrocytiques, de quelques centroblastes, et des lymphocytes T réactionnels parfois nombreux rappelant l'histologie des lymphomes folliculaires nodaux. Cependant, il existe des LCP-CF à grandes cellules souvent d'architecture diffuse, soit formés de grands centrocytes clivés ("spindle-shaped cells"), soit mélangés dans des proportions variables avec des cellules rondes centroblastiques. L'infiltrat lymphoïde est de nature B-lymphocytaire (CD20+, CD79a+, CD3-, CD5-). Les follicules anormaux sont composés de cellules des centres folliculaires BCL6+, CD10 variable (Suárez et al. 2013b), dans un réseau désorganisé de cellules folliculaires dendritiques CD21+ (De Leval et al. 2001). L'expression de BCL2 est difficile d'interprétation, les lymphocytes T réactionnels parfois présents au sein de l'infiltrat malin étant BCL2+, elle est rarement positive sur plus de 50% des lymphocytes B (Willemze et al. 2005). Un réarrangement du gène *IGH* est mis en évidence dans la majorité des cas au niveau des lésions cutanées (Lukowsky et al. 2006). Les marqueurs IRF4/MUM1 et FOXP1 sont habituellement négatifs, si on considère que plus de 30% des cellules tumorales doivent l'exprimer (10% des cas et 3,8% des cas, respectivement) (Senff et al. 2007).

Sur le plan moléculaire, les études publiées sont controversées (tableau 3). La prévalence de la t(14;18), translocation réciproque entre le gène *IGH* et l'oncogène *BCL2*, caractéristique des lymphomes folliculaires ganglionnaires, n'est pas bien déterminée dans les LCP-CF, les résultats d'études rapportées dans la littérature étant hétérogènes (tableau 3). En 2002, Mirza et al. l'évaluent à 34% (11 cas sur 32 sont positifs par PCR) (Mirza et al. 2002). En 2005, Kim et al. identifient 4 cas positifs par FISH sur 13 soit 31% (Kim et al. 2005). La même année, Vergier et al (notre équipe) rapportent 30% (9/30) de positivité en PCR mais 0% en FISH (0/17). Lors de ce travail, des analyses complémentaires par microdissection nous ont amenés à conclure que les cas positifs en PCR et négatifs en FISH correspondaient à des porteurs sains de la t(14;18)(q32;q21) sans lien avec le lymphome cutané (Vergier et al.

2004). Cependant, l'année suivante, Streubel et al. ont rapporté 11 cas sur 27 positifs en FISH (41%) mais aucun en PCR en utilisant le protocole standardisé BIOMED2 (Streubel et al. 2006). D'autre part, les résultats positifs pour la détection de la t(14;18) décrits dans certaines séries pourraient aussi s'expliquer par l'inclusion dans ces études de cas de localisation cutanées secondaires ou inaugurales d'une atteinte systémique non identifiée au diagnostic et pour lesquelles on ne disposait pas de recul suffisant. La prévalence de cette translocation, ainsi que son utilité clinique (valeur diagnostique, pronostique), reste un sujet d'actualité.

L'évolution est lente en l'absence de traitement, les lésions grossissent lentement pouvant rester limitées à la peau pendant des années. Le pronostic est très bon avec une survie globale et spécifique à 5 ans de 87% et 95%, respectivement. Les facteurs de mauvais pronostic en termes de survie sont la localisation à la jambe, qui est rare, et l'expression du marqueur FOXP1 (Senff et al. 2007). Ces deux caractéristiques sont associées au lymphome B diffus à grandes cellules de type jambe. Les récurrences cutanées sont courantes (30 à 45 % des cas), ne modifient pas le pronostic et sont habituellement confinées à la peau (Senff et al. 2008b; Suárez et al. 2013b). L'évolution extra-cutanée peut survenir mais rarement, dans 5 à 10% des cas (Senff et al. 2007). Le traitement est similaire à celui du LCP-ZM: radiothérapie dans les formes localisées, RITUXIMAB dans les formes multifocales non accessibles à un traitement local. Une forme multifocale n'est pas de plus mauvais pronostic, alors que la localisation à la jambe pourrait l'être (Suárez et al. 2013b).

c. Lymphome cutané B diffus à grandes cellules de type jambe (LCBDGC-TJ)

Cette entité, initialement rapportée en 1996 (Vermeer et al. 1996) se différencie des deux autres par son comportement plus agressif, considéré de pronostic « intermédiaire » (Willemze et al. 2005). Ce type de lymphome représente environ 15% des lymphomes cutanés B et 4% des LCP. Le LCBDGC-TJ touche classiquement la ou les membres inférieurs du sujet âgé, avec l'apparition rapidement progressive de tumeur(s) érythémateuses, violacées, pouvant être ulcérées. Les localisations en dehors de la jambe sont plus rares, survenant dans 20 à 30% des cas (Grange et al. 2007, 2014). Les femmes sont plus souvent atteintes (sex ratio 1,47) avec un âge médian de 78 ans.

Au plan histologique, il s'agit d'un infiltrat diffus de grandes cellules rondes, s'étendant souvent jusqu'à l'hypoderme. Il est constitué d'une population monotone centroblastique ou immunoblastique, avec de fréquentes images de mitoses. L'infiltrat réactionnel T est habituellement peu abondant. Ces cellules sont de phénotype B lymphocytaire (CD20+, CD79a+, CD3-, CD5-) et sont caractérisées par une forte expression de BCL2, IRF4/MUM1 et FOXP1. Elles sont généralement BCL6+ et CD10- (Willemze et al. 2005).

L'évolution clinique est rapide, avec des lésions qui grossissent et se multiplient. Le pronostic est mauvais, ce qui justifie une prise en charge thérapeutique plus lourde que les autres lymphomes cutanés B, même chez des patients âgés, calquée sur les schémas thérapeutiques utilisés chez des patients âgés atteints de lymphomes B diffus à grandes cellules ganglionnaires (Feugier et al. 2005; Coiffier 2007; Peyrade et al. 2011). Une étude récente rétrospective démontre l'intérêt d'un traitement comportant une polychimiothérapie associée au RITUXIMAB chez les patients atteints de LCBGDC-TJ, par rapport aux autres traitements, en termes de gain de survie (Grange et al. 2014). Les recommandations actuelles privilégient cette option thérapeutique, même chez les patients âgés (Senff et al. 2008b; Grange et al. 2010). En effet, avec ce type de combinaison thérapeutique, la survie spécifique à 5 ans est de 74%, alors que les chiffres publiés dans cette pathologie avant cette étude étaient de l'ordre de 50% (Grange et al. 2007; Senff et al. 2007). Comme dans les lymphomes ganglionnaires, le RITUXIMAB pourrait permettre un gain d'environ 25% en survie globale à 5 ans. Cependant, malgré ces avancées thérapeutiques, les rechutes restent fréquentes (50% des cas), cutanées ou extra-cutanées (Grange et al. 2014). Les cas non répondeurs au traitement (environ 30%) nécessitent aussi une prise en charge adaptée. Pour ces patients, d'autres études thérapeutiques sont nécessaires, guidées par la compréhension de la biologie de ces lymphomes.

Sur le plan moléculaire, peu d'études se sont intéressées aux anomalies chromosomiques associées aux LCBGC-TJ (tableau 3). L'anomalie la mieux connue est l'inactivation de la région du gène *CDKN2A* (locus 9p21) qui encode les protéines p14ARF et p16, impliquées dans le cycle cellulaire. Cette inactivation, par délétion ou par méthylation du promoteur est retrouvée dans 70% des cas de LCBGC-MI et est associée à un mauvais pronostic (Dijkman et al. 2006b; Belaud-Rotureau et al. 2008; Senff et al. 2009). Cependant, dans ce type de lymphome la FISH avec des sondes commerciales ne permet pas de détecter toutes les délétions qui sont parfois de petite taille. Elles peuvent être mises en évidence par d'autres techniques comme la MLPA (Senff et al. 2009) ou une FISH avec une sonde plus courte (Wiesner et al. 2009). La présence de mutations hypersomatiques aberrantes dans le gène *BC6* a été mise en évidence, associée à un taux élevé de l'ARNm de l'enzyme activation-induced cytidine deaminase (AID) (Dijkman et al. 2006a). AID est nécessaire aux phénomènes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique lors de la différenciation lymphoïde normale des cellules B dans le centre germinatif, processus pouvant être à l'origine de mutations et de translocations liées à cette recombinaison ou commutation secondaire. Des réarrangements de *BCL6* et de *MYC* ont aussi été observés sur de petites séries (Hallermann et al. 2004; Belaud-Rotureau et al. 2008). Au plan de l'expression protéique, les LCBGC-MI surexpriment *BCL2*, protéine connue pour son rôle anti-apoptotique, ainsi que *FOXP1* et *IRF4/MUM1*. Des gains et amplifications des loci de *BCL2* et *MALT1* (18q) ont été mis en évidence par CGH (Wiesner et al. 2005; Dijkman et al. 2006b) dans plus de la moitié des cas de LCBGC-MI, ainsi que des copies supplémentaires de *FOXP1* et d'*IRF4/MUM1* sans réarrangement associé (Pham-Ledard et al. 2010; Espinet et al. 2011). L'expression cytoplasmique d'IgM (+/- IgD) (Koens et al. 2010), associé à la

coexpression aberrante de IRF4/MUM1 et de BCL6 peut suggérer un blocage terminal de la différenciation plasmocytaire avec commutation isotypique défectueuse.

d. Parallèle entre les lymphomes cutanés B et les lymphomes ganglionnaires

Si la distinction entre lymphomes B cutanés primitif et lymphome cutané secondaire à un lymphome systémique est essentielle au diagnostic et à la prise en charge des patients du fait des différences fondamentales en termes de comportement clinique et de pronostic, établir un parallèle anatomo-pathologique et biologique est tentant au niveau scientifique.

En effet, les aspects histologiques morphologiques et phénotypiques sont souvent proches. Ainsi, l'étude biologique, cytogénétique et moléculaire des lymphomes cutanés peut être orientée par les progrès faits dans la connaissance de la lymphomagenèse des lymphomes ganglionnaires. Dans ce travail, nous nous analyserons principalement les lymphomes cutanés B diffus à grandes cellules de type jambe. La dernière partie concerne l'étude des lymphomes cutanés B des centres folliculaires (analogie avec les lymphomes folliculaires systémiques).

Type de lymphome	Phénotype des cellules tumorales	Anomalies moléculaires associées (fréquence)	Gène	Protéine / Voie impliquée	Références
Lymphome B des centres folliculaires	CD20+, BCL6+, CD10 -/+, CD43 -/+, BCL2 -/+, MUM1 rare, FOXP1 rare IgM- Réseau CFD CD23+ CCNA42 désorganisé	t(14;18)(q32;q21) : (fréquence controversée)	<i>IGH-BCL2</i>	Surexpression protéine BCL2 (oncogène)	Geelen (1998) Child (2001) Vergier (2004) Aguilera (2001) Lawnicki (2002) Mirza (2002) Kim (2005) Streubel (2006)
Lymphome B de la zone marginale	CD20+, BCL6-, CD10-, CD5-, CD43+, BCL2+ Plasmocytes monotypiques CD138+, IRF4/MUM1+	t(11,18)(q21;q21): 0% t(1;14)(p22;q32): 0% t(14,18)(q32;q21): 3/11 t(3 ;14)(p14 ;q32): 2/20	<i>API2-MALT1</i> <i>BCL10-IGH</i> <i>IGH-MALT1</i> <i>FOXP1-IGH</i>	Activation MALT1 (survie) Surexpression FOXP1	Hallerman (2004) Schreudel (2005) Streubel (2003) Streubel (2005)
Lymphome B diffus à grandes cellules de type jambe	CD20+, BCL2+, BCL6+, CD10-, MUM1/IRF4+, MIB1 +++, FOXP1+++, IgM+ IgD+/-	t(8;14): 5/14 cas et 2/6 cas Réarrangement 3q27: 5/14 cas Hypermutation de BCL6 Amplification de 18q Gains de FOXP1 Gains de IRF4/MUM1 Délétion 9p21 (70%)	<i>IGH-MYC (ou IGH, IGL)</i> <i>BCL6</i> <i>MALT1 et BCL2</i> <i>FOXP1</i> <i>IRF4/MUM1</i> <i>CDKN2A</i>	activation c-MYC (oncogène: métabolisme, croissance) activation BCL6 (oncogène: survie, prolifération, différenciation) activation de BCL2 et MALT1 (oncogènes: survie) ? ? Inactivation p16 (gène suppresseur de tumeur, prolifération)	Hallerman(2004) Belaud-Rotureau (2008) Wiesner (2005) Dijkman (2006) Dijkman (2006) Espinet (2011) Pham-Ledard (2010) Senff (2009) Dijkman (2006) Belaud-Rotureau (2008)

Tableau 3: résumé des caractéristiques phénotypiques et moléculaires connues au sein des lymphomes cutanés B (actualisé avant le début de la thèse, en 2011).

4. Les lymphomes B ganglionnaires

Parmi les lymphomes B systémiques, le stade de maturation ou cellule B saine à partir de laquelle s'est développée la prolifération tumorale clonale a été défini à chaque fois que cela est possible. L'analyse de la morphologie cellulaire, du profil d'expression protéique, du profil mutationnel des séquences variables du gène des immunoglobulines et du gène *BCL6*, et l'expression en surface des immunoglobulines a permis de supposer une origine cellulaire aux types de lymphomes B les plus fréquents (figure 11), cette contrepartie ou cellule B ressemblante étant aussi appelée "cellule d'origine". Les proliférations lymphoïdes issues d'une cellule B pré centre germinatif sont rares, et sont caractérisées par l'absence de mutations dans la partie variable du gène des immunoglobulines, comprennent la majorité des lymphomes du manteau et quelques sous-types de leucémie lymphoïde chronique et lymphome lymphocytaire (Shaffer et al. 2012). Cela souligne le rôle potentiel de la sélection par l'antigène dans la lymphomagenèse, ainsi que le potentiel oncogénique probable d'acquérir des anomalies génétiques ponctuelles ou structurales lors des phénomènes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique.

Les cellules B du centre germinatif sont la contrepartie physiologique des lymphomes folliculaires, du lymphome de Burkitt, et des LBDGC de type "germinal center". Les cellules B post centre germinatif semblent être à l'origine des lymphomes de la zone marginale, des LBDGC de type activé ("activated B-cell"), de la leucémie à tricholeucocytes. Deux types de lymphomes dérivent de cellules B thymiques: la maladie de Hodgkin scléronodulaire classique et le lymphome primitif du médiastin.

Cependant, certaines anomalies oncogéniques peuvent également survenir en amont de la cellule d'origine de ces lymphomes à un stade plus immature que la cellule B représentant la contrepartie physiologique du lymphome. En effet, un événement oncogénique "driver" peut arriver plus précocement dans la différenciation B, autorisant tout de même la cellule immortalisée à accomplir ensuite plusieurs étapes de l'immunopoïèse (pouvant aussi s'accompagner de l'acquisition d'anomalies génétiques secondaires). La véritable cellule d'origine peut être dans certains cas plus immature que ce que l'on pourrait déterminer par nos analyses. Par exemple, la contrepartie physiologique admise du lymphome folliculaire est une cellule B du centre germinatif. Cependant, la caractéristique génétique de ce lymphome est la translocation t(14;18) entre l'oncogène *BCL2* et le gène *IGH*. Cette anomalie paraît pourtant être provoquée très précocement au cours de la lymphopoïèse, causée par les recombinaisons RAG (actives lors du réarrangement VH-DH-JH lors de la formation du pré BCR dans la moelle osseuse). Ainsi, il existe des porteurs sains t(14;18), et il a été montré que ces cellules avaient pourtant un profil de cellule B-mémoire, indiquant que ces cellules ont accompli leur maturation dans le centre germinatif, après avoir acquis la t(14;18) précocement dans la moelle osseuse (Roulland et al. 2006).

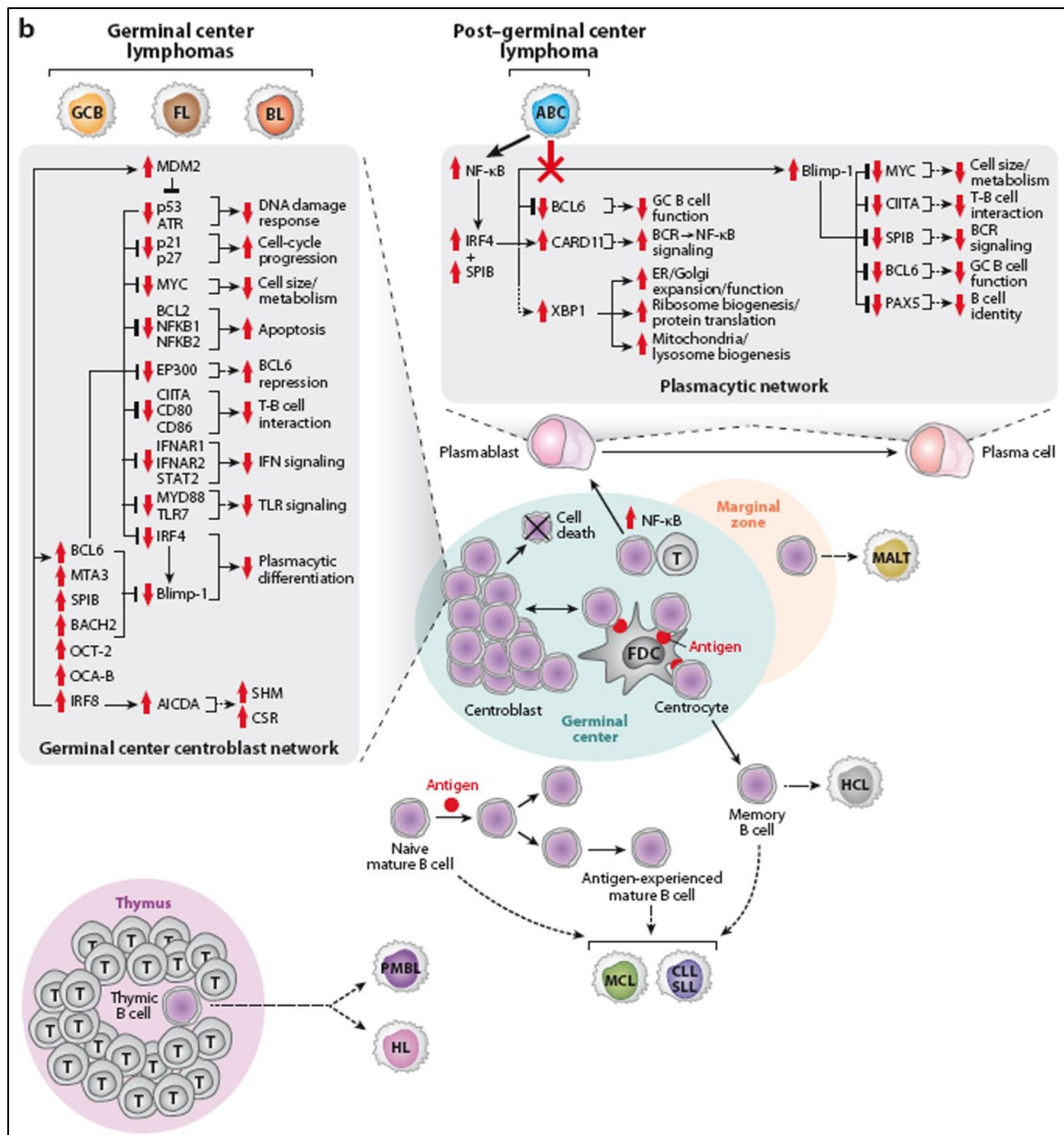


Figure 11: Différenciation lymphocytaire B et lymphomagenèse (d'après Shaffer A, Young R and Staudt LM, *Annu Rev Immunol*, 2012). Origine présumée des différents lymphomes B ganglionnaires.

ABC: lymphome B diffus à grandes cellules de type "activated B-cell", BL: *Burkitt lymphoma* (lymphome de Burkitt), CLL: *chronic lymphoid leukemia* (leucémie lymphoïde chronique), FL: *follicular lymphoma* (lymphome folliculaire), GCB: lymphome B diffus à grandes cellules de type "germinal center", HCL: *hairy-cell leukemia* (leucémie à tricholeucocytes), HL: *Hodgkin lymphoma* (maladie de Hodgkin), MALT: *mucosa associated lymphoid tissue lymphoma* (lymphome de la zone marginale), MCL: *mantle cell lymphoma* (lymphome du manteau), PMBL: *primary mediastinal B-cell lymphoma* (lymphome primitif du médiastin).

5. Lymphomes B diffus à grandes cellules NOS: données cytogénétiques et moléculaires.

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) représentent le type le plus fréquent de lymphomes non hodgkiniens, avec une incidence annuelle en France de 11000

nouveaux cas (données Inca 2010). Ils représentent 30 à 40% des nouveaux diagnostics de lymphomes non-hodgkiniens (Pasqualucci et Dalla-Favera 2014). Ils constituent un groupe hétérogène de lymphomes agressifs. Ils peuvent survenir de novo ou survenir au cours de l'évolution ou la progression d'un autre lymphome. Selon la classification WHO 2008, le LBDGC se définit comme une prolifération diffuse de grandes cellules lymphoïdes néoplasiques de la lignée B, dont la taille du noyau est de plus de deux fois la taille de celui d'un lymphocyte normal (Swerdlow 2008). Différentes études ont permis de les subdiviser en sous-groupes. Le premier, le plus hétérogène et le plus important, constitue le groupe NOS (not otherwise specified). Le deuxième est celui des LBDGC de localisation extra-nodale, qui comprend le lymphome cutané B diffus à grandes cellules de type jambe.

L'âge médian est de 70 ans, mais des cas peuvent survenir chez des enfants ou de jeunes adultes. Le sexe masculin est plus touché. Ils ont un commun un pronostic sombre, même s'il existe une hétérogénéité clinique et évolutive qui reflète certainement l'hétérogénéité moléculaire et biologique que nous allons aborder ensuite. Avec l'avènement du RITUXIMAB, anticorps monoclonal antiCD20 utilisé en combinaison une polychimiothérapie, le pronostic s'est amélioré (Coiffier et al. 2002), mais il reste mauvais en particulier en cas de rechute ou chez les patients réfractaires (30% des malades). La survie globale à 5 ans est évaluée à 58% chez les 60-80ans (Feugier et al. 2005) traités par combinaison R-CHOP. La compréhension des mécanismes biologiques et génétiques à l'origine de ces lymphomes pourrait donc permettre de distinguer, dès le diagnostic, de sous-types différents. Cette classification pourrait permettre d'identifier différentes catégories pronostiques de patients, mais aussi d'identifier des cibles moléculaires pouvant faire l'objet d'un traitement ciblé par une anomalie identifiée (test théranostique en médecine personnalisée), et/ou corrélée à la réponse thérapeutique (biomarqueur prédictif).

Dans les années 90, c'est l'essor de la cytogénétique qui permet d'avancer dans la compréhension de la lymphomagenèse. A partir de la cytogénétique conventionnelle difficilement applicable en routine à l'étude des lymphomes du fait de la nécessité de mise en culture et division des cellules malignes (afin de visualiser des chromosomes en métaphase), des techniques d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), applicables à du matériel fixé, se sont développées. Ainsi, différentes translocations récurrentes ont été identifiées au sein des lymphomes B diffus à grandes cellules, impliquant des proto-oncogènes comme *BCL2* (Gascoyne et al. 1997), *BCL6* (Bastard et al. 1994), *MYC* (Savage et al. 2009; Barrans et al. 2010). Différentes études ont tenté de relier l'expression de ces protéines oncogènes au pronostic des patients, avec des résultats parfois contradictoires. Finalement, une étude du Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) a proposé un index combinant immunohistochimie et FISH (expression de FOXP1, IRF4/MUM1, et réarrangement de *BCL6*) pour prédire le pronostic des malades (Copie-Bergman et al. 2009). L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs comme *CDKN2A/CDKN2B* encodant les

protéines p14, p15 et p16, a aussi été identifiée comme un événement fréquent et ayant une valeur pronostique péjorative au sein des LBDGC (Jardin et al. 2010).

Si les LBDGC ont pour point commun une présentation clinique agressive, ces premières analyses de FISH ont révélé une hétérogénéité moléculaire. Dans les années 2000, c'est l'étude du profil d'expression des gènes (transcriptome) qui a permis de montrer que les LBDGC NOS pouvaient être regroupés en deux catégories principales, ceux dont le transcriptome est proche de celui des lymphocytes B normaux du centre germinatif (type GC pour "germinal center") et ceux dont le transcriptome est proche d'un lymphocyte B activé via le BCR ou la molécule CD40 (type ABC pour "activated B-cell") (Alizadeh et al. 2000). Ces catégories transcriptomiques ne sont pas corrélée à un sous-type morphologique, l'intérêt de ce regroupement est le pronostic distinct entre les deux groupes, étudié initialement sur une série de patients traités par CHOP: les LBDGC de type ABC ont un pronostic plus sombre avec une survie à 5 ans de 39% et une âge plus élevé (60ans), versus 60% pour le groupe GC (Rosenwald et al. 2002). Ces données ont été confirmée à l'ère du CHOP combiné au RITUXIMAB (Lenz, 2008). Un troisième type de LBDGC a été découvert, ne montrant ni un profil GC ni un profil ABC, touchant plus souvent des patients jeunes au niveau du thorax: il est alors nommé "Primary Mediastinal B-cell Lymphoma" (PMBCL). L'étude du transcriptome a permis de relier d'une part ce type de LBDGC au lymphome de Hodgkin, avec activation de la voie JAK/STAT et expression du CD30 (Rosenwald et al. 2003, Gunawardana et al. 2014), et d'autre part aux LBDGC avec activation de la voie NFκB.

La signature des LBDGC de type GC comprend des marqueurs connus associés au centre germinatif (CD10, CD38, BCL6, LMO2) alors que celle des LBDGC de type ABC comporte notamment les protéines IRF4/MUM1, FOXP1, FLIP, BCL2. Ce transcriptome identifiant ces 2 catégories de pronostic différent ne peut malheureusement pas être réalisé en routine, c'est pourquoi différents algorithmes reposant sur l'analyse de l'expression des protéines identifiée par une technique d'immunohistochimie sur coupe de tissu fixé ont été proposés, utilisant une combinaison de 3 marqueurs comme CD10, BCL6 et IR4/MUM1 (algorithme de Hans) ou de 5 marqueurs comme BCL6, IRF4/MUM1, FOXP1, CD10 et GCTE1 (Hans et al. 2004; Choi et al. 2009; Meyer et al. 2011). Ces algorithmes ont été utilisés en routine mais leur reproductibilité reste à démontrer. L'analyse du type de BCR et notamment l'isotype d'immunoglobuline détectable en immunohistochimie (IgM, IgD, IgG ou IgA) peut aussi permettre de classifier les LBDGC (Ruminy et al. 2011). Plus récemment, une autre technique applicable à des tissus fixés et inclus en paraffine a été proposée pour remplacer de manière fiable l'analyse extensive du transcriptome: c'est l'analyse digitale de l'expression de 20 gènes sélectionnés (NanoString) (Scott et al. 2014). Tous ces travaux de recherche clinique montrant la différence de comportement clinique entre ces catégories distinctes de LBDGC reflétant une biologie et une cellule d'origine différente, montre l'intérêt manifeste de tenter de présumer de la cellule d'origine pour comprendre la lymphomagenèse, et l'importance du référentiel théorique qu'est la réponse immune physiologique dans l'analyse des lymphomes. S'y ajoutent les lymphomes B diffus à grandes

cellules touchant des sites particuliers, comme le système nerveux central, le testicule, la peau. Les études moléculaires de ces sous-types montrent que si des anomalies moléculaires sont communes avec les autres LBDGC, leur répartition est différente.

Plus récemment, les techniques de séquençage massif ou haut débit (*Next generation sequencing*, NGS) ont permis d'identifier des mutations récurrentes, réparties de manière différentes dans l'un ou l'autre sous-type transcriptomique, ABC ou GC. Ces mutations sont parfois communes avec d'autres lymphomes B ou leucémies (tableaux 4 et 5). La plupart de ces mutations concernent des gènes jouant un rôle important dans la fonction biologique du lymphocyte B (différenciation, signalisation du BCR, voie NF- κ B et voie phosphatidylinositol-3-OHkinase (PI3K), la réponse immunitaire (Toll-like récepteurs), l'apoptose et le cycle cellulaire, la conformation chromatinienne. A ce jour, plus de 200 exomes complets de LBDGC ont été séquencés et publiés (Morin et al. 2010, 2011, 2013; Ngo et al. 2011a; Pasqualucci et al. 2011a, 2011b; Lohr et al. 2012; Zhang et al. 2013; Bohers et al. 2014) identifiant de multiples gènes impliqués et pouvant représenter des biomarqueurs potentiels ou des cibles thérapeutiques (pour revue voir Jardin 2014). Cependant, les mutations identifiées sont hétérogènes entre les patients, mais aussi entre les études publiées. Si le taux de mutation est relativement faible (3,3 par Mb) par rapport à d'autres tumeurs, notamment certaines tumeurs solides comme le mélanome (Lawrence et al. 2014), il existe cependant un panachage mutationnel impliquant au moins une vingtaine de gènes par tumeur dans les LBDGC. Même si certaines anomalies sont communes aux sous-type GC et ABC des LBDGC, la plupart sont prédominantes dans l'une ou l'autre entité (Tableaux 4 et 5).

a. Mutations et anomalies identifiées principalement dans les LBDGC de type GC

Ces lymphomes sont caractérisés par l'expression d'une centaine de gènes qui définissent le stade des cellules B des centres germinatifs, notamment la protéine BCL6. BCL6 est un transcrit majeur surexprimé dans la signature transcriptionnel des LBDGC de type GC. Il s'agit d'un répresseur transcriptionnel favorisant, dans le centre germinatif, la prolifération des B en modulant la transcription des gènes impliqués dans la régulation du cycle, la prolifération, l'activation, le switch et la différenciation. La surexpression de BCL6 peut être liée à une translocation (10% des GC, et 30% des ABC), ou à des mutations de l'intron 1 qui sont bien plus fréquentes dans le type GC (75%) que ABC (44%). BCL6 peut aussi être dérégulé par mécanisme épigénétique, du fait de mutations touchant des gènes modificateur des histones comme CREBBP ou EP300, modulant ainsi la conformation chromatinienne (Rui et al. 2011). La surexpression de BCL6 réprime la protéine anti-apoptotique BCL2, mais ces lymphomes peuvent contourner ce mécanisme grâce à l'acquisition de la translocation t(14;18) dans 35% des cas qui va permettre au promoteur du gène *IGH*, ainsi juxtaposé à *BCL2*, de provoquer la surexpression dérégulée de BCL2 (Rui et

al. 2011). Les gains en 3p27, en revanche, ne semblent pas corrélés à une surexpression. Les translocations de l'oncogène *MYC* (7%) sont associées au type GC, même si elles peuvent exister dans les LBDGC de type ABC, d'autres altérations pouvant conduire à la surexpression de la protéine *MYC* (Savage et al. 2009; Barrans et al. 2010; Kluk et al. 2012).

Une autre caractéristique des ces lymphomes est l'activation de la voie PI3K/AKT, qui peut être liée à différents mécanismes.

Mécanismes activant la voie PI3K/AKT

➤ **Anomalies du gène *PTEN***

Les délétions du gène suppresseur de tumeur *PTEN* (Phosphatase sans TENSin homolog) font partie des anomalies chromosomiques qui caractérisent le type GC, détectées dans 15% des cas (Lenz et Staudt 2010). D'autres mécanismes peuvent conduire à son inactivation puisque 55% des tumeurs ont une perte de l'expression de *PTEN*, comme des mutations ou l'expression de microARN (*cf infra*). Étant donné que le statut d'expression de *PTEN* est inversement corrélé à l'activation de la voie PI3K/AKT, la perte d'expression de *PTEN* dans ces lymphomes fournit une explication à l'expression constitutive de la voie PI3K/AKT, favorisant la prolifération et la survie des cellules tumorales (Pfeifer et al. 2013).

➤ **Surexpression du MiR-17-92**

La perte d'expression de *PTEN* peut également être la conséquence de l'amplification du locus du miR-17-92, provoquant sa surexpression, connue pour réguler négativement *PTEN* (Xiao et al. 2008).

Mécanismes de dérégulation épigénétique

➤ **Mutations du gène *MLL2* (mixed lineage leukemia 2)**

MLL2 est une histone méthyltransférase responsable de la triméthylation du résidu Lys4 de l'histone 3 (H3K4), contrôlant la répression transcriptionnelle. Les mutations inactivatrices (non sens, insertions/délétions décalant le cadre de lecture) de *MLL2* concernent surtout les lymphomes folliculaires (89% des cas), mais sont aussi présentes dans 30% des LBDGC de type GC et 20% des LBDGC de type ABC (Pasqualucci et al. 2011b). Les prédictions de l'effet de ces mutations sont de générer une protéine tronquée, sans domaine catalytique SET indispensable à l'activité méthyltransférase de la protéine. Les conséquences fonctionnelles de cette inactivation de *MLL2* n'ont pas été étudiées mais ces éléments suggèrent un rôle suppresseur de tumeur à *MLL2* (Morin et al. 2011; Pasqualucci et al. 2011b).

➤ **Mutations du gène *EZH2***

Le gène *EZH2* code pour une histone méthyltransférase responsable de la triméthylation du résidu Lys27 de l'histone H3 (H3K27). Cette méthyltransférase appartient au complexe protéique PRC2 responsable de la méthylation de H3K27 et de la répression transcriptionnelle. La mutation d'*EZH2* au niveau de la Tyrosine 641 (Tyr641), initialement rapportée comme associée à une perte de fonction, a finalement été mieux caractérisée et conduit à augmenter l'activité de méthylation d'*EZH2*, en synergie avec la protéine sauvage codé par l'allèle non muté (McCabe et al. 2012). Elle est observée dans 22% des LDGCB de type GCB, 7 % des lymphomes folliculaires (LF) mais est absente dans les LDGCB de type ABC (Morin et al. 2011).

➤ **Mutations des acétyltransférases *CREBBP* et *EP300***

Des mutations de ces 2 acétyltransférases, *CREBBP* de manière plus fréquente que *EP300*, concernent 39% des LBDGC (et 41% des lymphomes folliculaires) (Pasqualucci et al. 2011a). Ces phosphoprotéines nucléaires sont exprimées de manière ubiquitaire et modifient à la fois les histones et les autres protéines nucléaires, en servant de co-activateurs transcriptionnels pour de multiples facteurs de transcription se liant à l'ADN, favorisant donc la transcription de certains gènes. Les mécanismes exacts de l'effet oncogénique des mutations identifiées de ces gènes ne sont pas complètement élucidés, du fait de la multiplicité des cibles moléculaires de ces acétyltransférases, mais les mutations affectent le domaine acétyl-transférase des protéines .

Autres altérations

➤ **Mutation de *GNA13***

Des mutation inactivatrices de *GNA13* ont été rapportées dans 32,6% des cas de LBDGC de type GC et très rarement dans les types non GC (<2%). Différentes mutations sont possibles, aboutissant soit à une protéine tronquée, soit à une altération au niveau du site catalytique GTPase. *GNA13* encode une protéine de type GTPase, qui régule l'adressage des cellules B et qui peut avoir un effet indirect sur la voie phosphatidylinositol-3-OHkinase PI3K/AKT (Morin et al. 2011, 2013; Zhang et al. 2013).

➤ **Amplification de *c-REL***

L'amplification de ce gène localisé sur le chromosome 2 codant pour une sous-unité du facteur de transcription NFκB est de manière inattendue une anomalie récurrente dans les LBDGC de type GC (27% des GC et 5% des ABC). Les conséquences de cette amplification

sont mal connues, et notamment n'est pas associée à l'expression de c-REL au niveau nucléaire, ni à une surexpression de NFκB (Staudt 2010).

b. Mutations et anomalies identifiées principalement dans les LBDGC de type ABC

Les LBDGC de type ABC sont caractérisés par une signature génique similaire à celle des lymphocytes B activés. La surexpression d'IRF4/MUM1, protéine régulatrice de la différenciation et la maturation des cellules lymphoïdes myéloïdes et dendritiques, en est une caractéristique, comme dans le myélome multiple. Cependant, dans les LBDGC de type ABC, la différenciation terminale en plasmocyte est bloquée, comme peut en attester l'absence de commutation isotypique (expression d'une IgM, contrairement aux LBDGC de type GC) alors que les gènes des immunoglobulines sont très mutés et qu'il existe une forte quantité d'AID, traduisant un stade post centre germinatif (Lenz et Staudt 2010). L'activité constitutive de la voie NFκB, caractéristique majeure des LBDGC de type ABC, est liée à des altérations de différentes voies moléculaires (Staudt 2010). Elle est responsable de l'expression d'IRF4/MUM1 qui est l'un des gènes cibles de NFκB, ce qui tend à pousser les cellules vers la différenciation plasmocytaire en provoquant l'activation de *PRDM1* qui encode BLIMP1. Cependant, d'autres mécanismes vont interférer et bloquer la différenciation, ce qui semble être un élément important de la pathogenèse des LBDGC de type ABC (Staudt 2010). L'activation constitutive de NFκB favorise la survie et la prolifération cellulaire ainsi que l'inhibition de l'apoptose, notamment par l'intermédiaire de la surexpression de *BCL2* qui est un des gènes cibles, comme *c-FLIP* et *Cycline D2*. D'autres mécanismes d'activation de *BCL2* sont connus: translocation (caractéristique des lymphomes folliculaires et présente dans certains LBDGC de type GC), ou amplification (dans 34% LBDGC de type ABC). La plupart des LBDGC de type ABC surexpriment cependant la protéine *BCL2* (Staudt 2010). Une autre conséquence de l'activation de NFκB est la production de cytokines IL-6 et IL-10, qui agissent via les kinases JAK et le facteur de transcription STAT3 en déterminant des signaux autocrines de survie.

NFκB est un complexe de cinq facteurs de transcription nommés RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 et NF-κB2 qui régulent des gènes cibles par la formation d'homo ou d'hétérodimères. En conditions physiologiques, cette voie est inhibée par la liaison de protéines (IκBα, IκBβ, et IκBε) au complexe NFκB. La stimulation de certains récepteurs de surface induit la phosphorylation de IκBα et sa dégradation par le protéasome ce qui a pour conséquence la libération du complexe NFκB et son activation en tant que facteur de transcription (Staudt 2010). Dans les LBDGC de type ABC, l'activation constitutive de NFκB est en grande majorité due à l'activation constitutive du complexe de signalisation CBM formé par l'association de CARD11, BCL10 et MALT1, nécessaire à l'activation de NFκB en aval de la signalisation via la voie du BCR (figure 12). Dans les cellules normales, ce complexe n'est activé de façon transitoire qu'après stimulation par l'antigène. Dans les cellules

tumorales, ce complexe peut être activé par l'intermédiaire de plusieurs altérations, concernant des protéines sur la voie du BCR, des Toll-like récepteurs, ou ayant une action directe sur NFκB (figure 13).

De plus, dans les LBDGC de type ABC, la voie PI3K/AKT est activée, soit par activation constitutive du BCR ("BCR signaling"), figure 12 et 13, soit par surexpression du miR 17-92, soit plus rarement que dans le type GC par inactivation de PTEN.

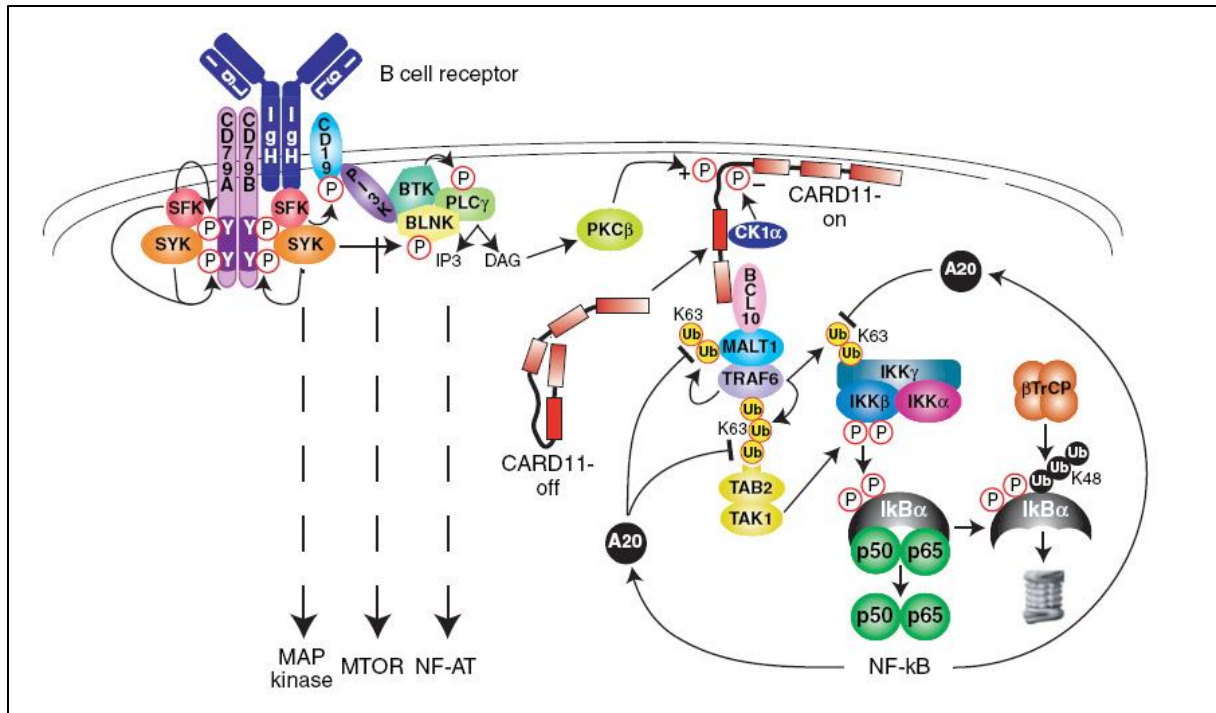


Figure 12: Représentation schématique de la voie du BCR pouvant activer NFκB (d'après Staudt, Cod Spring Harb Perspect Biol 2010). Le signal proximal est initié via le BCR par les kinases de la famille SRC (LYN, FYN, FGR, et BLK), qui phosphorylent les motifs ITAMs des molécules CD79a et CD79b du BCR. SYK est alors recrutée au site phosphorylé, et activée pour phosphoryler d'autres protéines. Les kinases de la famille SRC activent PI3K qui recrute BTK et les protéines associées BLNK et phospholipase Cγ2 à la membrane plasmique. Du Diacylglycerol (DAG) est généré, qui active la protéine kinase Cβ (PKCβ) qui phosphoryle et active CARD11. CARD11 recrute alors BCL10 et MALT1 pour former le complexe de signalisation CBM.

Voie du Récepteur B ("chronic BCR signaling"), aboutissant à l'activation de la voie NFκB

➤ Mutations des gènes *CD79A/CD79B*

Les gènes codants pour les sous-unités CD79A/CD79B (récepteurs à motifs ITAM) du BCR sont mutés dans 23% des LDGCB de type ABC (Davis et al. 2010). Ces molécules sont des éléments essentiels de la cascade de signalisation du BCR (figure 1 et 12), permettant la transduction du signal et ainsi l'activation des voies NF-κB, PI3K, et mitogen-activated protein (MAP) kinase. Dix-huit % des LBDGC de type ABC sont porteurs d'une mutation du premier résidu tyrosine du motif ITAM de la protéine CD79B. Cela conduit à augmenter à la surface cellulaire l'expression du BCR, diminuer le rétrocontrôle négatif exercé par la

protéine Lyn sur cette voie, permettant ainsi une activation constitutionnelle de ce récepteur (« chronic BCR signaling ») (Rui et al. 2011). Plus rarement (2,9%), il s'agit d'une mutation de la sous-unité CD79A qui provoque l'activation de cette voie.

➤ **Mutations de *CARD11***

Environ 9% des LBDGC de type ABC sont porteurs d'une mutation oncogénique de *CARD11*, gène qui encode un composant majeur du complexe CBM (Lenz et al. 2008a). *CARD11* est indispensable à la transduction entre le signal et l'activation du BCR et la voie NF- κ B (figures 12, 13). Les mutations de *CARD11*, touchant une structure en hélice alpha indispensable à la dimérisation de *CARD11*, forme des grandes structures cytoplasmiques colocalisant avec MALT1 et entraînant une activation constitutive de NF- κ B, sans passer par l'activation médiée par le signal du BCR (Rui et al. 2011).

Autres mutations activant la voie NF κ B

➤ **Mutations du gène *MYD88* (voie des récepteurs Toll-like)**

Les mutations du gène *MYD88* sont observées dans 39% des LDGCB de type ABC (Ngo et al. 2011a). *MYD88* est une protéine adaptatrice des récepteurs Toll-like (TLR) et des récepteurs à l'interleukine 1 (figures 13 et 14). La mutation la plus fréquente (29% des ABC) consiste en une substitution nucléotidique (T>C) sur la région codante du gène *MYD88* au codon 265 (mutation L265P), provoquant un changement d'acide aminé (une proline remplace une valine). Cette modification se situe au niveau d'une région clé de la protéine *MYD88* qui est le domaine d'interaction avec les récepteurs (domaine Toll/IL-1 receptor (TIR). Le mutant L265P s'associe à un gain de fonction et favorise la survie cellulaire en permettant la formation de complexes protéiques IRAK-1 et IRAK-4, l'activation de la voie NF- κ B, la sécrétion d'IL-6, IL-10 et d'interféron β et l'activation de STAT3 par les JAK kinases (Ngo et al. 2011a). Il s'agit donc d'une mutation oncogénique importante considérée comme "driver" de l'oncogenèse (Jeelall et Horikawa 2011). La mutation L265P de *MYD88* est aussi caractéristique de la maladie de Waldenström (>90% des cas) (Xu et al. 2013; Yang et al. 2013). Elle est aussi fréquemment observée dans les LBDGC du système nerveux central (75% des cas) (Gonzalez-Aguilar et al. 2012), du testicule (71% des cas) (Kraan et al. 2013), qui sont des sites immunitaires particuliers dits de "privilège immun". Elle peut aussi être observée dans les lymphomes B du MALT (9% des lymphomes du MALT gastriques), et 3% des leucémies lymphoïdes chroniques (Ngo et al. 2011b). Concernant la leucémie lymphoïde chronique, la présence de mutation de *MYD88* ou de la voie des TLRs pourrait définir un sous-groupe de patients plus jeunes et de meilleur pronostic (Martínez-Trillos et al. 2014). Au contraire, dans les LBDGC, la mutation *MYD88* est associée à un âge plus avancé (Bohers et al. 2014). D'autres mutations de *MYD88* ont été décrites, comme S219C ou S243N dans les LBDGC de type ABC et GC et la leucémie lymphoïde chronique, ou V217F, M232T dans les type ABC (Ngo et al. 2011a).

➤ **Altérations de *TNFAIP3/A20* (régulateur négatif de NFκB)**

TNFAIP3/A20 est un gène qui encode une enzyme impliquée dans la signalisation NF-κB terminale, via l'interaction avec MALT1 (figures 13 et 14). Il s'agit d'un régulateur négatif qui à l'état physiologique est un inhibiteur de la voie NF-κB. C'est donc son inactivation, par différents mécanismes (délétions bialléliques, mutations), qui va favoriser la lymphomagenèse en induisant une activation prolongée et inappropriée de NF-κB (Pasqualucci 2013). Dans 30% des cas de LBDGC de type ABC, une inactivation a été mise en évidence (Compagno et al. 2009; Kato et al. 2009).

Altération de la différenciation lymphocytaire B terminale: dérégulation de *BCL6* et inactivation de *PRDM1/BLIMP1*

BCL6 est un répresseur transcriptionnel qui se fixe sur le promoteur de différents gènes cibles impliqués dans de multiples voies moléculaires et réprime ainsi leur expression. Parmi ces voies, le cycle cellulaire (apoptose notamment, via la répression de BCL2), la différenciation lymphocytaire B terminale (via PRDM1/BLIMP1), l'activation lymphocytaire et l'inflammation sont contrôlées par BCL6 (Shaffer et al. 2000). La protéine BCL6 est exprimée dans les lymphocytes B des centres germinatifs et par une partie des lymphocytes T des follicules secondaires (les lymphocytes T auxiliaires ou "helper" folliculaires, qui expriment aussi CXCL13 et PD-1 (Gaulard and de Leval 2011). Une grande variété de mécanismes génétiques à l'origine d'une dérégulation du gène ont été identifiés et sont susceptibles d'être impliqués dans l'oncogenèse des lymphomes. Des translocations de *BCL6* sont présentes dans environ 35% des LBDGC, avec une fréquence un peu plus importantes dans les types ABC (Barrans et al. 2002). Cet événement chromosomique, en juxtaposant le domaine codant de *BCL6* à une autre séquence (plus de 20 partenaires identifiés), lève l'inhibition de *BCL6* associée à la différenciation post centre germinatif normale. De plus, la surexpression de *BCL6* peut être induite par des délétions du gène (parfois associées à une translocation) ou par des mutations somatiques (Pasqualucci et al. 2003), acquises lors de l'hypermutation somatique ciblée sur le gène des Ig. Du fait de ces mécanismes multiples et distincts pouvant activer *BCL6*, c'est l'expression de la protéine qui a montré une valeur pronostique dans les LBDGC (Lossos et al. 2001).

Lors de la différenciation physiologique B terminale (vers le plasmocyte), l'inhibition de l'expression de BCL6 est nécessaire à l'expression de PRDM1/BLIMP1, protéine clé régulatrice de la différenciation plasmocytaire normale. Dans la majorité des LBDGC de type ABC, cette voie n'est plus fonctionnelle et la différenciation terminale est "bloquée", soit par inactivation de *PRDM1/BLIMP1* (mutations inactivatrices ou délétions - 25% des cas), soit par mécanisme indirect via la dérégulation de BCL6 (25% des cas) (Pasqualucci et al. 2006; Mandelbaum et al. 2010). Ces mécanismes sont mutuellement exclusifs.

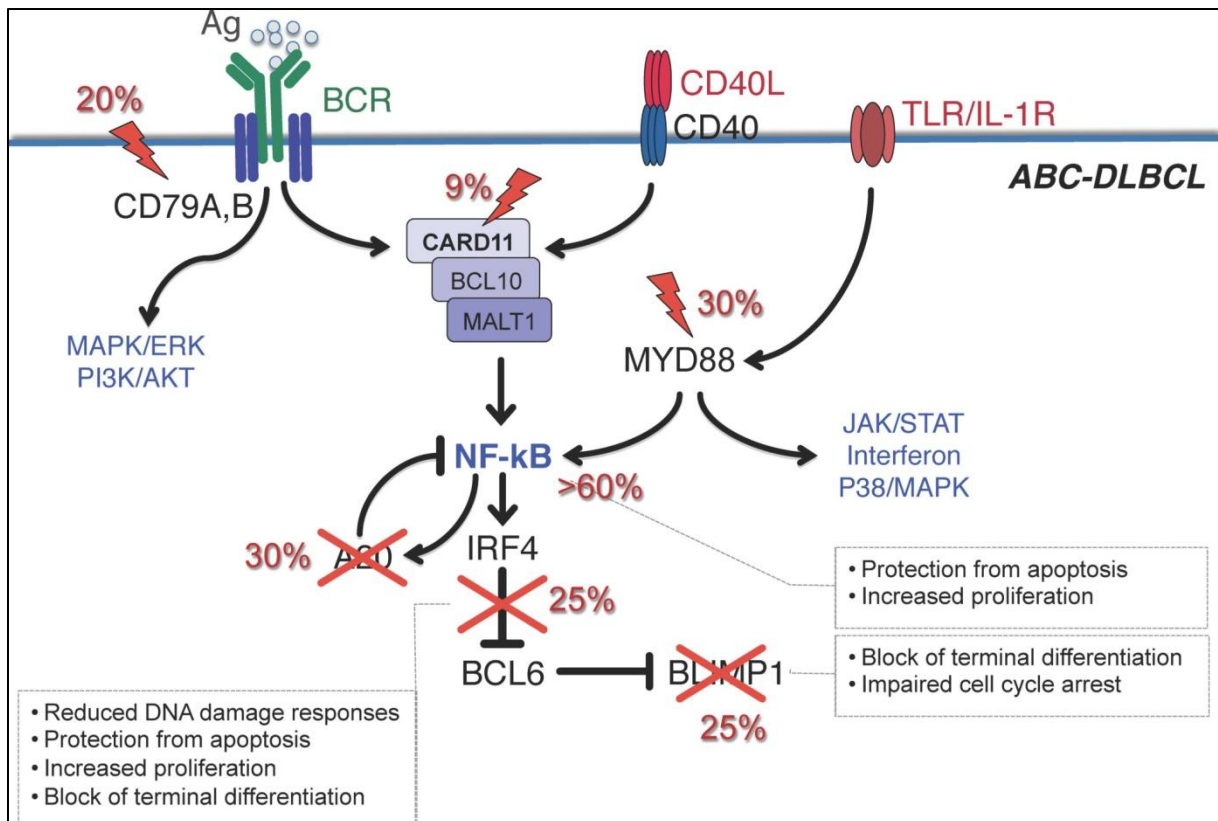


Figure 13: Voies moléculaires impliquées dans la lymphomagenèse des lymphomes B diffus à grandes cellules de type ABC (Pasqualucci, Current opinion in hematology, 2014). Représentation schématique d'un centrocyte du centre germinatif, exprimant un BCR fonctionnel, le récepteur CD40 et le récepteur Toll-like / IL1-R. L'engagement de ces différentes voies chez un lymphocyte normal aboutit à l'activation du complexe NFκB, et induit l'expression de certaines de gènes cibles, incluant IRF4/MUM1 et A20, régulateur négatif de NFκB. IRF4 inhibe alors l'expression de BCL6, ce qui permet au régulateur de la différenciation plasmocytaire PRDM1/BLIMP1 d'être exprimé et d'agir en provoquant la différenciation plasmocytaire.

Dans les LBDGC de type ABC, plusieurs altérations génétiques interrompent ce circuit à de multiples niveaux et contribuent à la lymphomagenèse en favorisant la fonction antiapoptotique de NFκB, ou en bloquant la différenciation B terminale. Les croix indiquent une mutation ou une délétion inactivatrice, les éclairs indiquent une mutation activatrice.

Autres anomalies associées au LBDGC de type ABC

D'autres anomalies ont été identifiées comme prédominantes dans les type ABC: Les délétions du locus 6p21 (gènes *CDKN2A/CDKN2B*, encodant les protéines p14, p15 et p16), sont fréquentes et concernent 37% des LBDGC, représentant un facteur de mauvais pronostic. Les délétions de *TP53* sont plus rares (6%), mais la co-existence de ces deux altérations est un facteur pronostic encore plus péjoratif (Jardin et al. 2010). Les mutations de *TP53* sont aussi corrélées à un mauvais pronostic (Young et al. 2008). Les trisomies 3 (associée à une surexpression de *FOXP1*) et les pertes de 6q21-22 sont aussi plus représentées dans ce groupe de LBDGC (Kluin et Schuurin 2011).

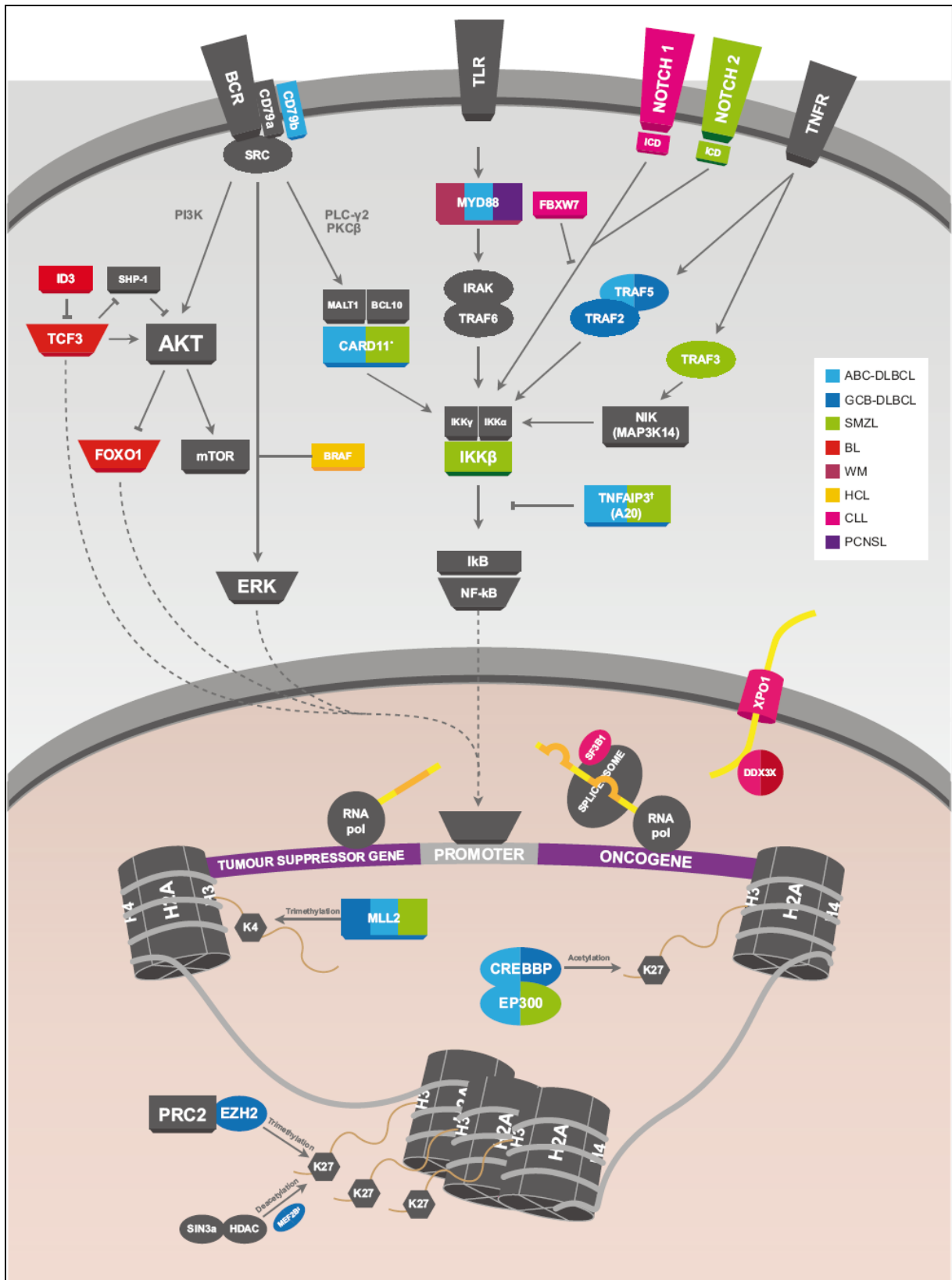


Figure 14: mécanismes intracellulaires impliqués dans lymphoproliférations B (Blombery PA et al, Leukemia lymphoma, 2014). PCNSL, primary central nervous system lymphoma; SMZL, splenic marginal zone lymphoma; ABC-DLBCL, activated B-cell type diffuse large B-cell lymphoma; GCB-DLBCL: germinal center B-cell type diffuse large B-cell lymphoma; BL, Burkitt lymphoma; WM, Waldenström macroglobulinemia; HCL, hairy cell leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia)

c. Importance du microenvironnement: signatures stromales, angiogenèse et microARNs

Signatures du stroma et angiogenèse

Une étude menée sur des patients atteints de LBDGC a permis de proposer un modèle composé de deux signatures distinctes, reflétant les caractéristiques des cellules non malignes du microenvironnement des cellules malignes. Ces signatures, nommées stromal-1 et stromal-2, sont capables de prédire la survie des patients traités par R-CHOP (Lenz et al. 2008b). La signature stromal-1 est de bon pronostic. Elle est caractérisée par des gènes codant pour des protéines de la matrice extra-cellulaire ou participant à son remodelage (fibronectine, collagène, matrix metalloprotease (MMP2, MMP9...)) ainsi que des gènes exprimés par la lignée monocyttaire supposant une infiltration histiocyttaire (CEBPA, CSF2RA). La signature stroma-2, de mauvais pronostic, est caractérisée par des gènes codant pour des marqueurs des cellules endothéliales (Von Willebrand Factor, CD31...), des régulateurs de l'angiogenèse (vascular endothelial growth factor VEGFR2...), CXCL12 (une chimiokine pro-angiogénique) ou des gènes exprimés par des adipocytes. Cette signature stroma-2 semblait reliée à une forte néoangiogenèse, et la densité importante de vaisseaux dans ces tumeurs a été observée (Lenz et al. 2008b). Suite à ces travaux, différentes équipes se sont intéressées à la signalisation du VEGF et à l'angiogenèse dans ces tumeurs. La protéine VEGF est fortement exprimée dans les LBDGC, mais non reliés au pronostic, contrairement à la densité vasculaire (Gratzinger et al. 2008). Finalement, c'est la forte expression de VEGFR2 qui a été corrélée à un mauvais pronostic, contrairement à VEGFR1 (Gratzinger et al. 2010).

Rôle des microARNs

Les microARNs (miR) sont des petites molécules d'ARN non codantes qui régulent l'expression des gènes à un niveau post-transcriptomique. Leur rôle dans l'initiation et la progression cancéreuse a été montrée dans de multiples types de tumeurs solides et dans les néoplasies du tissu hématopoïétique comme les lymphomes (Troppan et al. 2014). Comprendre la fonction biologique des miR est une tâche difficile, étant donné qu'un miR peut cibler de multiples ARN messagers, et vice versa de multiples miR peuvent influencer le même ARN messager. Cependant, l'effet de certains miR sont bien caractérisés.

Par exemple, les miR-125a et miR-125b, fréquemment surexprimés dans les LBDGC, ont pour cible le TNFAIP3/A20, régulateur négatif de NFκB, et par conséquent augmente l'activation de la voie NFκB (Kim et al. 2012).

Le miR-155, dont la surexpression est associée au LBDGC de type ABC, TP53INP1 (tumor protein p53-inducible nuclear protein 1), et PIK3KR, un régulateur négatif de la voie PI3K/AKT (Troppan et al. 2014).

L'analyse du "miRnome" des cellules B normales et des d'hémopathies a permis de rechercher une signature et d'étudier des centaines de nouveaux miR (Jima et al. 2010). Des dizaines de publications identifient de nouveaux miR comme impliqué dans les lymphomes, pouvant avoir une valeur diagnostique ou pronostique.

Type de lymphome	Fréquence	Phénotype des cellules tumorales	Anomalies moléculaires associées	Voie moléculaire impliquée et conséquences	Clinique
Lymphome du manteau	7%	CD20, CD5, CyclineD1, CD10-, CD23- (SOX11)	<u>t(11;14)(q13;q32)</u> >95% <i>CCND1-IGH</i> (et mutations) <i>mutation TP53</i> : 20 à 45% <i>mutation ATM</i> : 40 à 75% <i>mutation NOTCH1/NOTCH2</i> : 5-12% <i>mutation MLL2</i> : 14%	surexpression cycline D1: Cycle cellulaire Intégrité du génome Intégrité du génome Blocage différenciation Histone méthyltransférase (épigénétique)	Age médian 55 ans Ganglions, intestin, sang, moelle osseuse Survie 5 ans 50%, Guérison <10%
Leucémie lymphoïde chronique/lymphome lymphocytaire	8%	CD79a, CD23, CD5, CD20 faible, CD22 faible	<u>Mutation NOTCH1</u> :<50% Del 13q14.3 : 30-50% (miR15a;miR16) Del 11q22 <i>ATM</i> : 10-20%	Blocage différenciation Survie, prolifération Intégrité du génome	Age médian 65 ans Sang, moelle osseuse, rate, ganglions Survie à 7 ans 70%, Guérison<20%
Lymphome folliculaire	25%	CD20, CD10, BCL2, BCL6	<u>t(14;18)(q32;q21)</u> > 80% <i>IGH-BCL2</i> <u>t(3)(q27)</u> (30% des <i>gd 3b</i>) <i>BCL6</i> <i>Mutation MLL2</i> (89%) <i>Mutation EZH2</i> (7%) <i>Mutation CREBBP</i> (40%)	Surexpression BCL2 (survie) Surexpression BCL6 Histone méthyltransférase (épigénétique) H3K27 méthyltransférase (épigénétique) Histone acétyltransférase (épigénétique)	Age médian 57 ans moelle osseuse et ganglions Survie à 10 ans 73% Guérison<20%
Lymphome de Burkitt <i>EBV - immunodépression</i>	<1%	CD20, CD10, BCL6, Ki67 élevé	<u>t(8;14)(q24;q32)</u> > 90% <i>MYC-IGH</i> (ou IGH, IGL) <u>13q3</u> > 50% (<i>miR-17-92</i>) <u>TCF3 et ID3</u> (mutation): 70%	Métabolisme, croissance Survie (inactive PTEN) Survie (active voie PI3K)	Age médian 11 ans (enfants et 24 ans (adultes) Extra ganglionnaire > ganglions Survie à 5 ans > 80% Guérison>80%
Lymphomes du MALT <i>Helicobacter Pylori</i> <i>Chlamydiae Psittaci</i> ...	9%	CD20, CD79a, CD5-, CD10-, CD23-	<u>t(11;18)(q21;q21)</u> <i>API2-MALT1</i> : 60% <u>t(14;18)(q32;q21)</u> (annexes) <i>IGH-MALT1</i> <u>t(3;14)</u> (extra-nodaux) <i>FOXP1-IGH</i> <u>T(1;14)(p22;q32)</u> <i>BCL10-IGH</i> <u>MYD88 L265P</u> (9%)	Survie (active MALT1) Survie (active MALT1) Survie (active BCL10) Active NFkB via les TLR	Age médian 60 ans Extra ganglionnaire et moelle osseuse (20%) Survie à 5 ans > 80% Guérison>50%
Leucémie à tricholeucocyte	<1%	CD20, CD22, CD79a	<u>BRAF V600E</u>	Survie, Prolifération (MAP kinase)	Age médian 55 ans, Rate, foie, sang Survie à 5 ans > 75%, Guérison<30%
Lymphome de Hodgkin <i>EBV</i>	11%	CD30, CD15, CD20-	<u>JAK2/JMJD2C</u> (ampli) : 30% <u>PTPN1</u> (mutation) : 20% <u>CIITA</u> (translocation): 15% <i>TNFAIP3</i> inactivation (11%)	Survie, métabolisme (JAK/STAT) Survie, métabolisme (JAK/STAT) Echappement immunitaire Survie (Activation NFkB)	Age médian 25 et 60 ans Médiastin, ganglions Survie à 15 ans 85% Guérison>80%
Lymphome lymphoplasmocytaire (dont maladie de Waldenström)	1%	CD20, CD79a, CD5-, CD10-, CD23-	<u>t(9;14)</u> <i>PAX5-IGH</i> rare <u>mutation MYD88 L265P</u> : > 95% Waldenström	Différenciation Survie (Activation NFkB)	Age médian 65 ans Paraprotéine Moelle osseuse, ganglions, rate

Tableau 4: résumé des caractéristiques cliniques, histologiques, phénotypiques et moléculaires (les plus fréquentes) des tumeurs B malignes, hors lymphomes B diffus à grandes cellules. Tableau adapté d'après Shaffer Young et Staudt, Annu Rev Immunol 2012, Kluin et Schuurin, Histopathology 2011. Concernant les anomalies moléculaires, les altérations activatrices apparaissent en souligné, les altérations perte de fonction en non souligné.

Type de lymphome	Phénotype des cellules tumorales	Gène	Conséquence protéine/ cellule	Voie de signalisation
LBDGC de type GC	CD20, CD79a, CD22, BCL6, CD10, IRF4/MUM1-, FOXP1- IgM-, IgG ou A +	<u>BCL2</u> (mutation, translocation): 35-45% <u>MYC</u> (translocation, mutations): 10% <u>BCL6</u> (translocations, mutations): 30% <u>MLL2</u> (mutation): 30% <u>CREBBP</u> (mutation): 41% <u>EZH2</u> (mutation): 22% <u>PTEN</u> (délétions 15%, mutations): <u>miR 17-92</u> : 12,5% (amplification) <u>GNA13</u> (mutation): 33% 2p14: <u>c-REL</u> (amplification): 30% <u>FOXO1</u> (mutation): <10%	Surexpression BCL2 Surexpression MYC Surexpression BCL6 Histone méthyltransférase Histone acétyltransférase H3K27 méthyltransférase Perte expression PTEN 55% inactivation PTEN GTPase (adressage des cellules B) Perte de fonction FOXO1	Antiapoptotique (survie) Métabolisme, croissance S survie, prolifération, différenciation Régulation épigénétique Régulation épigénétique Régulation épigénétique Activation PI3K/AKT/mTOR (survie, prolifération) Activation PI3K/AKT/mTOR (survie, prolifération) RhoGTPase signaling: PI3K/AKT Activation NfκB? Echappement immunitaire, mauvais pronostic
LBDGC de type ABC	CD20, CD79a, CD22, BCL6+/-, CD10-, IRF4/MUM1+, FOXP1+, IgM ou IgD+	<u>BCL6</u> (mutation, translocation): 35% <u>PRDM1/BLIMP1</u> (délétions, mutations): 25% <u>MYD88</u> (mutations): 29% <u>CARD11</u> (mutations): 10% <u>CD79B/A</u> (mutations): 21% <u>TNFAIP3/A20</u> (délétion, mutation): 30% 18q <u>BCL2</u> (amplifications): 13% Del 6p21 <u>CDKN2A/2B</u> : 25-30% Tri 3 <u>FOXP1</u> : (gains, ampli) <u>MLL2</u> (mutations): 20% <u>CREBBP</u> (mutations): 17% <u>SPIB</u> (gain, amplification) <u>FOXO1</u> (mutations): <10%	Surexpression BCL6 Perte expression BLIMP1 Protéine adaptatrice entre TLR et NfκB Couple BCR à NfκB Composant du BCR Inhibe l'activation NfκB Surexpression BCL2 (survie) Perte expression p16 (se lie à CDK4/6) Surexpression FOXP1 Histone méthyltransférase Histone acétyltransférase Facteur de transcription (famille ETS) Facteur de transcription, suppresseur de tumeur	Survie, prolifération, différenciation Blocage différentiation plamocytaire Activation de NfκB via TLR Activation constitutive de NfκB Activation de NfκB par "BCR signalling" Activation de NfκB par levée de l'inhibition Blocage de l'apoptose Cycle cellulaire Survie Régulation épigénétique Régulation épigénétique Différenciation lymphocytaire B Echappement immunitaire
LBDGC du système nerveux central		<u>CARD11</u> (mutations): 16% <u>MYD88</u> L265P (mutations): 75% <u>CD79B</u> (mutations): 30-60% <u>TNFAIP3/A20</u> (deletion, mutation): 19% <u>PIM1</u> (mutations): 22% <u>TBL1XR1</u> (mutations): 19%	Couple BCR à NfκB Protéine adaptatrice entre TLR et NfκB Composant du BCR Inhibe l'activation NfκB Serine Thréonine kinase, coopère avec BCL6 Régulateur transcriptionnel	Activation constitutive de NfκB Activation de NfκB via TLR et JAK/STAT3 Activation de NfκB via BCR signalling Activation de NfκB par levée d'inhibition ? Activation NfκB?
LBP du médiastin		<u>BCL6</u> (translocation): 33% <u>9p24: JAK2/JMJD2C</u> (amplifications, gains): 30-45% <u>PTPN1</u> (mutations): 22% <u>SOCS1</u> (mutations): 45% <u>STAT6</u> (mutations): 36% <u>TNFAIP3/A20</u> (mutations, délétions): 36% 2p14: <u>c-REL</u> (gains): 70% <u>PDL1/PDL2</u> (amplifications, gains): 30-45% <u>CIITA</u> (translocations): 38%	Surexpression BCL6 Activation JAK2 Activation JAK/STAT Régulation négative de JAK2 Activation STAT Inhibe l'activation NfκB Sous-unité de la famille REL-NfκB Inhibe la fonction lymphocytaire T Echappement immunitaire	Survie, prolifération, différenciation Activation de la voie JAK/STAT Activation de la voie JAK/STAT Activation de la voie JAK/STAT Activation de la voie JAK/STAT Activation de NfκB par levée de l'inhibition Activation NfκB Echappement immunitaire Echappement immunitaire

Tableau 5: résumé des caractéristiques phénotypiques et moléculaires (les plus fréquentes) des lymphomes B diffus à grandes cellules, hors cutanés. Tableau adapté d'après Pasqualucci L et Dalla-Favera R, Cancer Cell, 2014; Shaffer Young et Staudt, Annu Rev Immunol 2012, et Kluin et Schuurin, Histopathology 2011; Lenz et Staudt, NEJM 2010; Bohers, Leuk lymphoma 2014). Concernant les anomalies moléculaires, les altérations activatrices apparaissent en souligné, les altérations perte de fonction en non souligné.

PARTIE II: RESULTATS

A. Première partie: étude du statut du gène *MYD88* au sein des lymphomes cutanés diffus à grandes cellules de type jambe

1. Contexte scientifique

Comme nous l'avons vu dans la partie d'introduction bibliographique, les lymphomes B diffus à grandes cellules de type jambe représentent, au sein des lymphomes cutanés B qui ont un bon pronostic, une entité particulière par son mauvais pronostic, qualifié d'intermédiaire dans la classification WHO 2008.

Les quelques publications ciblées sur les mécanismes d'oncogenèse à l'origine des ces lymphomes pouvaient suggérer des mécanismes communs avec les lymphomes B diffus à grandes cellules NOS ganglionnaires, en particulier le type ABC. En effet, au plan morphologique et phénotypique, le profil de ces lymphomes est identique aux LBDGC de type ABC, notamment par leur expression forte de *BCL2*, *IRF4/MUM1*, *FOXP1*. Une étude transcriptomique sur 13 cas avait permis de confirmer cette hypothèse, montrant la surexpression de gènes connus pour appartenir à la signature "ABC", comme *IgM*, *PIM1*, ou *IRF4/MUM1* (Hoefnagel et al. 2005). De plus, des translocations impliquant *BCL6* ou *MYC* avaient été mises en évidence dans ces lymphomes, non spécifiques au type ABC mais rapportées dans les LBDGC de type GC et ABC, contrairement aux autres sous-types de lymphomes cutanés B où ce type de réarrangement chromosomique semblait relativement exceptionnel. Enfin, comme dans les LBDGC et plus spécifiquement le type ABC, l'inactivation de *CDKN2A/p16* liée à une délétion et ou méthylation de la région 9p21, avait été rapportée comme fréquente, touchant 70% des malades, et représentant un facteur de mauvais pronostic (Senff et al. 2009). Ces éléments nous ont incité à explorer le statut du gène *MYD88*, du fait de la publication en 2011 de la mutation driver de l'oncogenèse L265P par l'équipe de Ngo et al, fortement associée aux LBDGC de type ABC. *MYD88* est une protéine adaptatrice indispensable à la signalisation de la majorité des récepteurs Toll-like (TLR), excepté TLR3, et des récepteurs à l'IL-1 et l'IL-14. Elle transduit le signal envoyé par la voie des TLR et active le facteur de transcription NFκB en formant des complexes avec les protéines IRAK1 et IRAK4. Sa présence est indispensable à la survie des lignées cellulaires de LBDGC de type ABC. L'article de Ngo et al montre que dans 39% des LBDGC de type ABC, le gène *MYD88* est muté et correspondent pour 29% à une seule mutation, la substitution leucine--> proline au codon 265 (L265P). Cette équipe a montré que cette substitution provoquait au niveau du domaine d'interaction avec le récepteur Toll/ IL-1 (domaine TIR), et provoquait des complexes permanents avec IRAK 1 et 4 conduisant à une activation permanente de NFκB, soulignant son rôle "driver" de l'oncogenèse.

2. Objectifs et méthodologie

L'objectif était de rechercher les mutations du gène *MYD88* au sein des LBDGC de type jambe. Afin de vérifier la spécificité de la mutation à ce sous-type de lymphome cutané B, nous avons inclus des cas de lymphomes cutanés B indolents. Toutes les mutations publiées par Ngo et al et localisées dans différents exons du gène, ont été recherchées par séquençage selon la méthode de Sanger, sur de l'ADN tumoral extrait à partir de biopsies cutanées congelées. En parallèle, une étude de l'ADN constitutionnel, obtenu par extraction de l'ADN de lymphocytes circulants, était effectuée, afin de vérifier le caractère somatique des mutations.

Dans un second temps, du fait des résultats sur cette première étude monocentrique (article 1), nous avons voulu savoir si la mutation de *MYD88* avait un impact pronostique. En monocentrique, l'étude de 16 cas ne permettait pas de conclure au plan statistique, mais un profil péjoratif se dessinait. C'est pourquoi nous avons étendu la recherche des mutations de *MYD88* à une plus grande cohorte multicentrique française, grâce à la collaboration du Groupe Français pour l'Etude des Lymphomes Cutanés et l'aide du Pr Florent Grange. Pour cela, nous avons été confronté à l'étude d'un matériel tumoral hétérogène, reflétant différents types de fixations utilisées par 12 centres depuis 20 ans. Sur ce type de matériel, le séquençage ne permettait d'obtenir des résultats interprétables que pour 50% des cas. , C'est pourquoi nous avons développé une technique de PCR en temps réel en raccourcissant la taille des amplicons et en optimisant les amorces. Une technique d'High Resolution Melting a été testée mais nous avons finalement retenu une PCR en temps réel avec détection spécifique d'allèle sauvage et muté à l'aide de (sondes Taqman spécifiques en réalisant ce test dans 2 réactions parallèles. L'étude de dilution et des cas précédemment publiés montrait que ceci permettait de détecter efficacement (grande sensibilité et spécificité) uniquement la mutation L265P.

3. Résultats et conclusions

L'étude monocentrique sur 38 patients a permis de montrer que **les mutations de *MYD88* étaient non seulement présentes dans les LBDGC de type jambe, mais surtout très fréquentes (11/16, 69%)**. Nous n'avons observé que la mutation L265P et aucune mutation par Sanger dans les autres exons. L'étude des 18 malades porteurs d'un lymphome B indolent (14 LCB-CF, 4 LCB-ZM), ne révélant aucune mutation, semblait indiquer que la mutation de *MYD88* est restreinte au LBDGC -TJ, pouvant avoir une valeur diagnostique dans certains cas de diagnostic difficile en pratique clinique.

Concernant l'étude multicentrique, nous avons pu obtenir du matériel tumoral pour 61 patients. Grâce à la technique de PCR allèle spécifique, 58 ont pu être analysés, avec une fréquence de mutation de 59%. Les analyses statistiques uni et multivariées ont permis de montrer que **la mutation *MYD88* est associée à une survie spécifique plus courte**, et que

MYD88^{L265P} est bien un facteur pronostique indépendant. Cette valeur pronostique était indépendante des autres paramètres et ne différait pas selon le type de traitement reçu (R CHOP vs autre traitement).

4. Publications: 2 articles

Article 1:

Pham-Ledard, A., Cappellen, D., Martinez, F., Vergier, B., Beylot-Barry, M., et Merlio, JP.

MYD88 somatic mutation is a general feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type.

J. Invest. Dermatol (2012). 132, 2118–2120.

Article 2:

Pham-Ledard, A, Beylot-Barry, M, Barbe, C, Leduc, M, Petrella, T, Vergier, B, Martinez, F, Cappellen, D, Merlio, JP, et Grange, F.

High frequency and clinical prognostic value of *MYD88* L265P mutation in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg-type.

JAMA Dermatol (2014) *en ligne*

expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood* 102:571-6

Sette A, Sidney J (1998) HLA supertypes and supermotifs: a functional perspective on HLA polymorphism. *Curr Opin Immunol* 10: 478-82

Van Tendeloo VF, Van de Velde A, Van DV *et al.* (2010) Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13824-9

Wenandy L, Sorensen RB, Svane IM *et al.* (2008) RhoC a new target for therapeutic vaccina-

tion against metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother* 57:1871-8

Xiang R, Mizutani N, Luo Y *et al.* (2005) A DNA vaccine targeting survivin combines apoptosis with suppression of angiogenesis in lung tumor eradication. *Cancer Res* 65: 553-61

MYD88 Somatic Mutation Is a Genetic Feature of Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg Type

Journal of Investigative Dermatology (2012) 132, 2118-2120; doi:10.1038/jid.2012.102; published online 12 April 2012

TO THE EDITOR

Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma leg type (PCDLBCL-LT) is a unique entity (ICD-O code 9680/3) individualized from other primary cutaneous B-cell lymphomas (PCBCL) and from nodal B-cell lymphomas by three main clinical features: preferential leg localization, occurrence in the elderly, and poor prognosis with a 45% 5-year survival rate (Vermeer *et al.*, 1996; Meijer *et al.*, 2008).

In nodal DLBCL, gene expression profiling has identified two main signatures, indicative of either germinal center (GC) or post-germinal center-activated B-cell (ABC) stages of B-cell differentiation (Alizadeh *et al.*, 2000). The ABC or post-GC type of DLBCL exhibits a poor overall survival together with a constitutive activation of the NF- κ B pathway and a higher proliferation index (Lenz and Staudt, 2010). Interestingly, the expression profile of PCDLBCL-LT is similar to that of the ABC type with constitutive NF- κ B pathway activation and strong expression of the IRF4/MUM1B-cell transcription factor, whereas primary cutaneous follicle center lymphoma (PCFCL), even with large cell morphology, belongs to the GC-like category (Hoefnagel *et al.*, 2005; Meijer *et al.*, 2008). An RNA interference screening for genes implicated in proliferation or survival of nodal B-cell lymphoma led to identify oncogenically active MYD88

mutations in 29% of nodal ABC-type DLBCL (Ngo *et al.*, 2011). This prompted us to investigate the MYD88 gene status in PCDLBCL-LT.

According to the Declaration of Helsinki Principles, the study was conducted after approval from the regional bioethics committee with informed written consent from the patient. Skin samples from 38 patients were analyzed: 16 with PCDLBCL-LT, 14 with PCFCL, 4 with primary cutaneous marginal-zone lymphoma (PCMZL), and 4 with secondary cutaneous DLBCL. For PCDLBCL-LT and secondary cutaneous DLBCL, the tumor cell content was estimated above 80% on routine sections and after immunostaining. PCFCL and PCMZL cases were similarly selected from surgical skin biopsies containing tumor cell content above 20%. DNA was extracted from frozen material in 35 cases and from formalin-fixed material in 3 cases with the QIAGEN DNA easy kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Constitutional DNA was extracted from blood samples matched to patients. Sanger sequencing of MYD88 was accomplished with the following primers: 5'-TCCCATGGAGC TCTGACCAC-3' and 5'-TAGSAGGAGA TGCCCAGTAT-3' (PCR amplification and sequencing exon 3); 5'-ATGCTGAA CTAAGTTGCCACA-3' and 5'-GAGGC CCCACCTACACATTC-3' (PCR amplification and sequencing exon 4); 5'-CTG

GGGTTGAAGACTGGGCT-3' and 5'-A TGGACAGGCAGACAGATAC-3' (PCR amplification and sequencing exon 5). The sequence of each amplified fragment was determined on both strands with the Big Dye Terminator v1.1 ready reaction cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France).

Among 16 cases of PCDLBCL-LT tested, a thymine to cytosine base transition at position 794 of the complementary DNA coding sequence (c. 794 T>C), causing a L265P—leucine to proline—amino-acid mutation, was detected in 11 cases (69%) (Table 1). All cases harboring the L265P mutation appeared heterozygous, as both normal and mutated alleles were detected at similar levels (Figure 1). None of our samples harbored any of the other mutations of MYD88 identified in nodal B-cell lymphoma cases (V217F, W218R, S219C, I220T, S222R, M232T, S243N, T294P) (Ngo *et al.*, 2011). In six PCDLBCL-LT cases for which matched germline DNA was available, the L265P MYD88 gene mutation was shown to be somatically acquired (Figure 1, Table 1). Clinical features of PCDLBCL-LT with L265P mutation (11/16, 69%) did not differ from those without MYD88 mutation (5/16, 31%). No correlation was found with prognosis (overall survival, progression free survival, time to relapse or specific death) or response to therapy (Table 1).

The MYD88 mutation was found to be specific for PCDLBCL-LT among other PCBCLs. None of the 14 PCFCL cases (three of them with large cell morphology) and none of the 4 PCMZL

Abbreviations: ABC, activated B cell; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; GC, germinal center; PCBCL, primary cutaneous B-cell lymphoma; PCFCL, primary cutaneous follicle center lymphoma; PCDLBCL-LT, primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type; PCMZL, primary cutaneous marginal zone lymphoma

Table 1. MYD88 status in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type

Case no.	Gender/age	Site	Final status (months)	MYD88 (tumor)	MYD88 (blood)
1	M/59	Leg	DD (13)	L265P	NA
2	M/72	Arm	DD (26)	L265P	No mutation
3	F/88	Arm	DD (5)	L265P	NA
4	F/88	Leg	AD (41)	L265P	NA
5	F/83	Trunk	CR (13)	L265P	No mutation
6	M/62	Leg	CR (31)	No mutation	ND
7	M/75	Arm	DD (18)	No mutation	ND
8	F/83	Leg	DA (41)	No mutation	ND
9	F/83	Leg	DD (11)	No mutation	ND
10	F/88	Leg	DD (39)	L265P	NA
11	F/81	Leg	AD (17)	L265P	No mutation
12	F/63	Leg	CR (12)	L265P	No mutation
13	F/75	Leg	DD (66)	L265P	No mutation
14	F/73	Leg	NA	L265P	NA
15	M/78	Leg	DD (3)	L265P	No mutation
16	M/90	Leg	NA	No mutation	ND

Abbreviations: AD, alive with disease; CR, complete remission; DA, dead of another cause; DD, dead of disease; NA, not available; ND, not done.

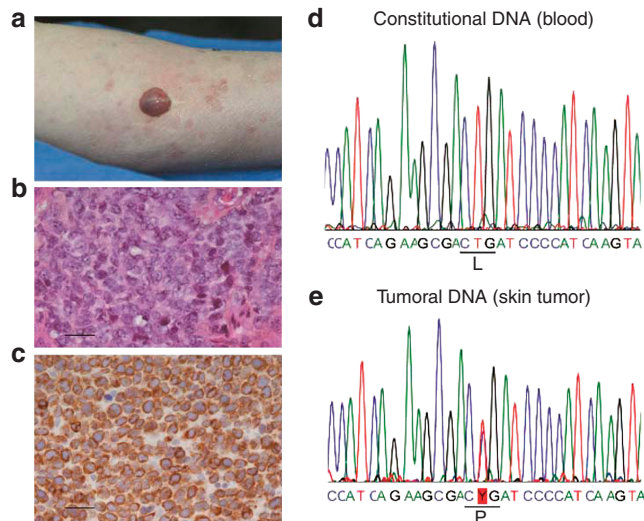


Figure 1. Clinical, histological, phenotypical features, and MYD88 analysis of case 4 (primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma). (a) Violaceous and erythematous leg skin tumor. (b) Hematoxylin, eosin, and safran (HES)-stained skin tumor section. Bar = 20 μ m. (c) Positivity of BCL2 immunostaining. Bar = 20 μ m. (d) Partial sequence (sense strand) of *MYD88* exon 5 from a normal constitutional DNA, centered on codon 265, encoding a leucine (L): the presence of a T nucleotide base at position 794 (c.794T) of the complementary DNA (cDNA) coding sequence. (e) Partial sequence (sense strand) of *MYD88* exon 5 from matching tumoral DNA (skin biopsy), centered on codon 265: the presence of both T and C nucleotide bases (Y = T or C) at position 794 of the cDNA coding sequence, indicating the presence of a heterozygous c.794 T>C nucleotide transition leading to a p.L256P—leucine to proline—mutation at amino-acid position 265.

cases displayed any *MYD88* mutation. A more extensive study of the PCMZL category would be relevant. A peculiar case of PCFCL with small-cell morphology followed by secondary extracutaneous nodal involvement with large-cell transformation did not carry *MYD88* mutation at both sites. The *MYD88* L265P mutation was found in one of the four secondary cutaneous DLBCL cases and cannot be used in differential diagnosis between primary and secondary cutaneous DLBCL. Moreover, L265P mutation and other non-synonymous mutations of the *MYD88* gene have been identified by massive parallel sequencing at lower frequencies in chronic lymphocytic leukemia (10%) and in gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma (9%) (Ngo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

Nodal ABC DLBCL may also harbor several genetic alterations involving *PRDM1/BLIMP1* (Pasqualucci *et al.*, 2006; Mandelbaum *et al.*, 2010), *CARD11 CD79A/B*, and/or *TNFAIP3* (also known as *A20*) genes (Lenz *et al.*, 2008a; Kato *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2010). These alterations may overlap with *MYD88* mutations, and the coding genome of DLBCL was shown to contain >30 clonally represented gene alterations per case (Ngo *et al.*, 2011; Pasqualucci *et al.*, 2011). Somatic hypermutation caused by sustained activation-induced cytidine deaminase (AID) activity has been found to contribute to several genetic mutations in cutaneous PCDLBCL-LT, as reported in nodal DLBCL (Dijkman *et al.*, 2006; Pasqualucci *et al.*, 2011). The T>C transition accounting for the L265P *MYD88* mutation cannot result from deamination of 5-methylcytosine residues but from other mechanisms driving the rapid development of PCDLBCL-LT at such site in elderly patients.

MYD88 is a universal adaptor protein through which most Toll-like receptors and receptors for IL-1 and IL-18 activate signaling pathways such as NF- κ B during normal immune innate response (Kawai and Akira, 2010). *MYD88* coordinates the assembly of a multi-subunit signaling complex including the IRAK1 and IRAK4 kinase. In ABC DLBCL cell lines, the *MYD88*

L265P protein was shown to form a stable complex containing phosphorylated IRAK1 and to promote NF- κ B and JAK-STAT3 signaling, conferring a selective advantage in cell survival (Ngo *et al.*, 2011).

Inhibitors of IRAK4 kinase of the MYD88 signaling complex were shown to inhibit cell survival in nodal ABC cell lines with MYD88 L265P mutation (Ngo *et al.*, 2011). The non-receptor tyrosine kinase BTK could also represent a good target for small molecules (Hendriks, 2011). The original high recurrence of MYD88 L265P mutation in PCDLBCL-LT (69%) may lead to evaluate the potential use of such targeted therapies.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique REV-LEG and from the Institut National Contre le Cancer (INCA) for supporting the Aquitaine database of cutaneous lymphoma register and the tumor bank of CHU de Bordeaux and Cancéro-pôle Grand Sud-Ouest. We also thank Dr Patrick Guillot and Dr Marie Parrens from CHU Bordeaux, Dr Houchingue Eghbali (Institut Bergonié, Bordeaux, France), and Dr Olivier Fitoussi (Clinique Bordeaux Nord Aquitaine, Bordeaux, France) for providing clinicopathological data.

**Anne Pham-Ledard^{1,2,5},
David Cappellen^{1,3,5},
Fabian Martinez³, Béatrice Vergier⁴,
Marie Beylot-Barry^{1,2} and
Jean-Philippe Merlio^{1,3}**

¹EA2406 Histology and Molecular Pathology of Tumours, University of Bordeaux, Bordeaux, France; ²Department of Dermatology, CHU de Bordeaux, Pessac, France; ³Tumor Bank and Tumor Biology Laboratory, CHU de Bordeaux, Pessac, France; ⁴Department of Pathology, CHU de Bordeaux, Pessac, France
E-mail: jp.merlio@u-bordeaux2.fr

⁵These authors contributed equally to this work.

REFERENCES

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE *et al.* (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503-11

Davis RE, Ngo VN, Lenz G *et al.* (2010) Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 463:88-92

Dijkman R, Tensen CP, Buettner M *et al.* (2006) Primary cutaneous follicle center lymphoma and primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type, are both targeted by aberrant somatic hypermutation but demonstrate differential expression of AID. *Blood* 107: 4926-9

Hendriks RW (2011) Drug discovery: new BTK inhibitor holds promise. *Nat Chem Biol* 7:4-5

Hoefnagel JJ, Dijkman R, Basso K *et al.* (2005) Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Blood* 105:3671-8

Kato M, Sanada M, Kato I *et al.* (2009) Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 459:712-6

Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-84

Lenz G, Davis RE, Ngo VN *et al.* (2008a) Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 319:1676-9

Lenz G, Staudt LM (2010) Aggressive lymphomas. *N Engl J Med* 362:1417-29

Mandelbaum J, Bhagat G, Tang H *et al.* (2010) BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 18:568-79

Meijer CLJM, Vergier B, Duncan LM, Willemze R (2008) Primary cutaneous DLBCL, leg type, 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 242

Ngo VN, Young RM, Schmitz R *et al.* (2011) Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 470:115-9

Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J *et al.* (2006) Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 203:311-7

Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G *et al.* (2011) Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* 41:830-7

Vermeer MH, Geelen FA, van Haselen CW *et al.* (1996) Primary cutaneous large B-cell lymphomas of the legs. A distinct type of cutaneous B-cell lymphoma with an intermediate prognosis. *Arch Dermatol* 132:1304-8

Wang L, Lawrence MS, Wan Y *et al.* (2011) SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 365:2497-506

Original Investigation

High Frequency and Clinical Prognostic Value of MYD88 L265P Mutation in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg-Type

Anne Pham-Ledard, MD; Marie Beylot-Barry, MD, PhD; Coralie Barbe, MD; Marion Leduc, MS; Tony Petrella, MD; Béatrice Vergier, MD, PhD; Fabian Martinez, MS; David Cappellen, PhD; Jean-Philippe Merlio, MD, PhD; Florent Grange, MD, PhD

IMPORTANCE The activating mutation of *MYD88* L265P is a frequent feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type (PCLBCL-LT), reported in up to 69% of the cases. Whether patients with *MYD88* mutation display specific clinical and evolutive features has not been evaluated.

OBJECTIVE To identify the clinical characteristics associated with *MYD88* mutation, confirm its high prevalence, and evaluate its effect on prognosis in patients with PCLBCL-LT.

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS A retrospective multicenter study was conducted using the medical records of patients from dermatology departments belonging to the French Study Group for Cutaneous Lymphomas. Sixty-one patients with a diagnosis of PCLBCL-LT made between 1988 and 2010 who were available for molecular study were included. Of these, 58 patients displaying interpretable results constituted the study group. Median follow-up was 33 months, and 39 patients (67%) were monitored until death.

MAIN OUTCOMES AND MEASURES Clinical features (age, sex, number of skin lesions, tumor stage, and location as leg vs elsewhere), *MYD88* mutation (allele-specific TaqMan polymerase chain reaction assay), treatment regimen, and outcome were recorded. Baseline characteristics and outcome were compared according to the status of *MYD88*.

RESULTS The median age of the patients was 79 years, and 59% were female. Skin lesions were located on the leg in 76% of the cases. Thirty-four of 58 patients (59%) harbored the *MYD88* L265P mutation. Patients had similar clinical characteristics at presentation regardless of their *MYD88* status, except that those harboring the *MYD88* mutation were older ($P = .006$) and had more frequent involvement of the leg ($P = .008$). Patients harboring the *MYD88* mutation had 3- and 5-year-specific survival rates of 65.7% and 60.2% vs 85.4% and 71.7% in patients with the wild-type allele. The *MYD88* mutation was significantly associated with shorter disease-specific survival in univariate ($P = .03$) and multivariate (odds ratio, 3.01; 95% CI, 1.03-8.78; $P = .04$) analysis. There was no significant difference between the groups in their treatment regimens. Considering overall survival, in univariate ($P = .002$) and multivariate (odds ratio, 2.94; 95% CI, 1.18-7.30; $P = .02$) analysis, *MYD88* L265P mutation was an independent adverse prognostic factor.

CONCLUSIONS AND RELEVANCE This study confirms the high prevalence of *MYD88* L265P mutation in PCLBCL-LT and shows its association with shorter survival. The clinical effect of *MYD88* mutation activating the nuclear factor- κ B pathway supports the use of targeted therapies at the time of relapse after conventional therapies.

JAMA Dermatol. doi:10.1001/jamadermatol.2014.821
Published online July 23, 2014.

Author Affiliations: Author affiliations are listed at the end of this article.

Corresponding Author: Jean-Philippe Merlio, MD, PhD, Equipe d'accueil, University Bordeaux, bâtiment 3B, 2ème étage, Zone Nord, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France (jp.merlio@u-bordeaux2.fr).

Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type (PCLBCL-LT) has been individualized in the World Health Organization¹ classification as an aggressive disease preferentially involving the legs, with rapidly growing tumors in the elderly. Understanding the oncogenesis of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) allows distinction of subgroups reflecting the cell-of-origin derivation at discrete stages of differentiation, namely activated B-cell-like (ABC) and germinal-center B-cell-like. Next-generation sequencing studies²⁻⁴ identified recurring and multiple genetic alterations implicated in the oncogenesis of nodal ABC-DLBCL, contributing to the nuclear factor- κ B pathway constitutive activity. Notably, mutations affecting the B-cell receptor signaling pathway (*CD79B* [GenBank 974])⁵ and other proteins affecting the nuclear factor- κ B signaling (most commonly, mutations of *MYD88* [GenBank 4615], *CARD11* [GenBank 84433], and *TNFAIP3/A20* [GenBank 7128]) have been reported.⁶⁻⁸ In PCLBCL-LT, gene expression profile analysis, cytogenetic and genetic mutation studies, and protein expression profile with high interferon regulatory factor 4 protein and melanoma-associated antigen expression bring PCLBCL-LT closer to the nodal ABC-DLBCL than to the germinal-center B-cell-like type.⁹⁻¹¹

A recent study reported¹² that among cutaneous B-cell lymphomas, PCLBCL-LT specifically exhibits a single driver mutation of *MYD88* (c.794T>C causing L265P-leucine to become proline) at a very high rate (69%). The protein MYD88, a Toll-like receptor-associated adaptor protein, is implicated in the signaling pathway during normal immune innate response. Furthermore, in a preliminary series, 18 patients¹¹ with PCLBCL-LT harboring the *MYD88* L265P mutation had a tendency to shorter specific survival; however, the finding did not reach statistical significance ($P = .10$). Another group¹⁰ confirmed the presence of *MYD88* mutations in a series of 10 cases of PCLBCL-LT, although at a lower prevalence (40%) than in the preliminary series.¹¹ These data prompted us to identify the *MYD88* mutation in a large multicenter series with available clinical and follow-up data, establish its real prevalence, and determine whether PCLBCL-LT harboring the *MYD88* L265P mutation displays specific clinical and evolutive features.

Methods

Patient Selection and Data Collection

According to the French Public Health and Bioethical Law, our study was considered by the research direction of Bordeaux University Hospital as noninterventional without need for ethics committee approval (Article L1121-1 and Article R1121-3). Moreover, both data and samples were collected and then used anonymously through the tumor bank of CHU de Bordeaux with declaration of the sample collection and associated clinical data to the French Research and Education Ministry and its bioethical unit (DC-2011-1293). Cases were retrieved retrospectively from records of the French Study Group for Cutaneous Lymphomas, from January 1, 1988, to December 31, 2010. All patients had been included in a French multicenter study.¹³

The study had been performed after patients had been given information and provided written informed consent, according to the Declaration of Helsinki protocols. Inclusion criteria were (1) a clinical and histologic diagnosis of PCLBCL-LT according to the World Health Organization-European Organization for Research and Treatment of Cancer classification¹⁴ assessed by an expert panel of physicians and pathologists, (2) available clinical and follow-up data, (3) absence of extracutaneous localization at diagnosis, and (4) available skin tumor samples for DNA analysis (formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsies).

MYD88 Analysis

DNA Extraction and Sanger Sequencing of MYD88

Extraction of DNA from skin biopsies and Sanger sequencing of *MYD88* gene was conducted. The process has been previously described.¹²

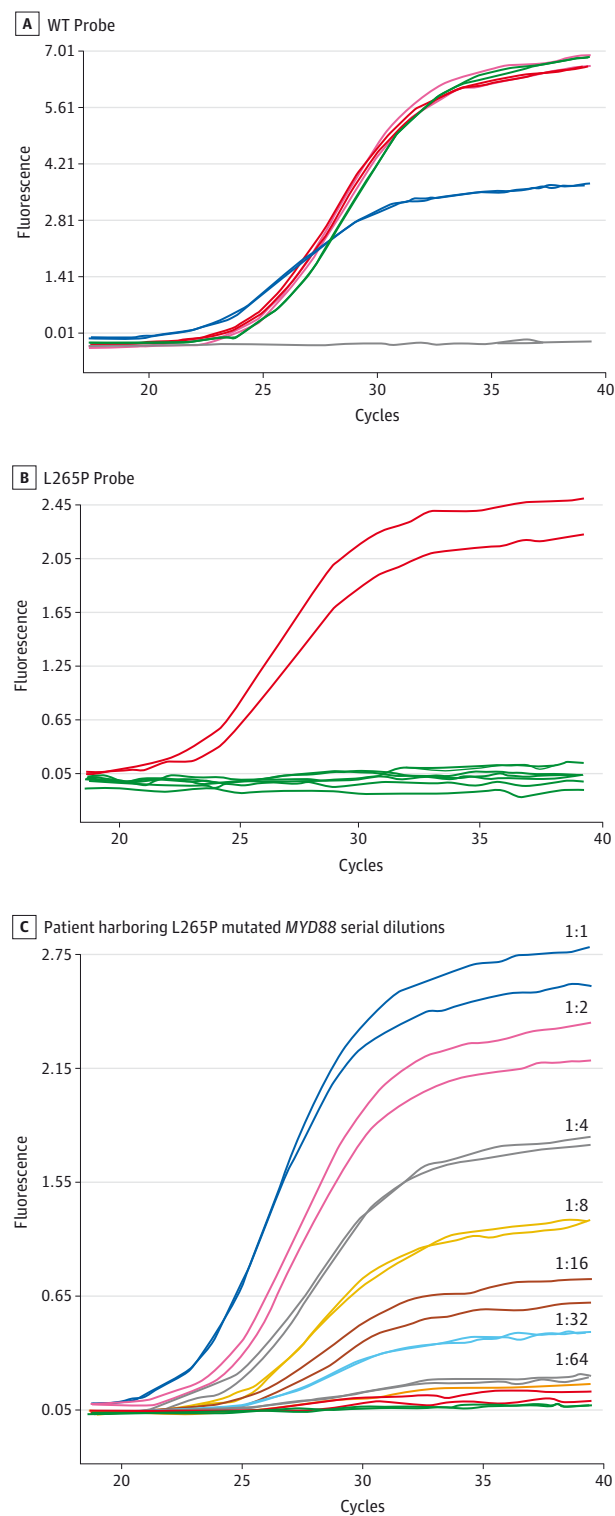
Allele-Specific Polymerase Chain Reaction With TaqMan Probes

Two primers were used to amplify a 132-base pair fragment located in exon 5 of the *MYD88* locus: forward: 5'-GTCCACCATGGGGCAAGG-3' (Sigma-Aldrich Co LLC) and reverse: 5'-GTGATGAACCTCAGGATGCTG-3'. Allele-specific polymerase chain reaction (PCR) was performed to detect either the wild-type (WT) allele or the *MYD88* mutated allele using two different probes designed with a centrally single base substitution corresponding to WT-*MYD88* and L265P-*MYD88*: *MYD88*^{WT}: [FAM]CAGAAGCGACTGATCCCCA[TAM] and *MYD88*^{L265P}: [6FAM]AGAAGCGACCGATCCCCAT[TAM] (Sigma-Aldrich Co LLC). Real-time PCR was performed (Roche Light Cycler 480; Roche Diagnostics). The cycles were conducted as follows: denaturing for 5 minutes at 95°C, followed by 45 cycles of 95°C for 10 seconds, then 64°C for 15 seconds, then 72°C for 25 seconds, and then cooling for 30 seconds at 40°C. A patient harboring the *MYD88* L265P mutation as determined by Sanger sequencing was used as a positive control, and healthy donors were used as negative controls. The sensitivity of PCR was assessed by PCR analysis of samples obtained by serial dilutions of tumoral DNA carrying the *MYD88* L265P mutation (Figure 1).

Statistical Analysis

Clinical and follow-up data were collected from a French multicenter clinical study.¹³ Data are described using median and range for quantitative variables and number and percentage for qualitative variables. Comparison between subgroups of patients according to *MYD88* status was performed using a χ^2 test or Fisher exact test, as appropriate. Disease-specific survival was calculated from diagnosis to the date of disease-related death or censoring. Patients whose deaths were unrelated to lymphoma were considered censored. Observed or overall survival duration was calculated from diagnosis to the date of death. The survival curves were established using the Kaplan-Meier method. Prognostic factors were identified by univariate analysis using the log-rank test and by multivariate analysis using a Cox proportional hazards model. Factors significant at the $P = .20$ level in univariate analysis were included in a stepwise regression multivariate analysis with entry and re-

Figure 1. Results of Allele-Specific TaqMan Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Detecting the *MYD88* L265P Mutation



A, A case harboring *MYD88* mutation. The blue line indicates a heterozygous wild-type (WT) allele with lower fluorescence than in the negative witness (purple, green, and pink lines). B, A case harboring the *MYD88* L265P mutation (red line). The green line represents the negative witness. C, Serial dilutions of a heterozygous case exhibiting the *MYD88* mutation.

moval limits set at $P = .20$. Multivariate analysis was systematically adjusted for age. Statistical analysis was performed using SAS, version 9.3 (SAS Institute Inc).

Results

Patients and Clinical Characteristics at Diagnosis

Sixty-one patients with PCLBCL-LT from 12 French centers met the inclusion criteria. Three cases were excluded because the DNA was not amplified for sequencing or by TaqMan PCR assay. Therefore, 58 patients constituted the study group. The main clinical characteristics, treatment regimens, and follow-up of these 58 patients according to their *MYD88* status are reported in the Table. The female to male ratio in the study group was 1.42. Age ranged from 50 to 96 years (mean, 76; median, 79 years). Skin lesions were localized on the leg in 44 cases (76%). The distribution of the TNM disease stage at diagnosis was category T1, 34%; T2, 45%; and T3, 21%.

MYD88 Analysis

The status of *MYD88* was first determined by Sanger sequencing using DNA extracted from paraffin-embedded material as in a previous study,¹² but only 32 of 61 cases displayed interpretable results, which is most probably attributable to pre-analytical factors (eg, use of various fixation procedures) and heterogeneity of storage duration and conditions between centers and samples (data not shown). Allele-specific TaqMan PCR permitted analysis of 58 of 61 available cases (95%). The *MYD88* L265P mutation was found in 34 of 58 (59%) PCLBCL-LT samples. Comparison of serial dilutions of a WT and heterozygous mutated case with the standard curve showed that the cycle threshold of the mutated and WT alleles was detected at a similar level for mutated cases, supporting the hypothesis that the mutation was always heterozygous (Figure 1).

Clinical Features According to *MYD88* Status

The clinical features of patients exhibiting the *MYD88* mutation compared with WT cases are summarized in the Table. Patients with *MYD88* L265P mutation were older ($P = .006$) and more frequently had skin tumors located on the leg ($P = .008$), whereas no significant difference was observed between the 2 groups for sex, number of skin lesions, TNM stage at diagnosis, and treatment regimens (rituximab plus polychemotherapy with or without anthracyclines vs other treatment regimens).

Clinical Outcome and Prognostic Factors

The evolution and final status of *MYD88* in the entire series are presented in the Table. Complete response was obtained in 42 cases (72%), without a significant difference between patients harboring the *MYD88* mutation and those without the mutation. Twenty-four of 42 patients (57%) had cutaneous relapses and 21 of 58 individuals (36%) experienced extracutaneous spreading. Median follow-up was 33 months, and 39 patients (67%) were monitored until death. Nineteen of 58 patients (33%) died of lymphoma, whereas 10 (17%) died from unrelated diseases. The 3- and 5-year overall survival rates of the entire study group were 66.0% and 51.8%, respectively.

Table. Main Findings at Diagnosis and Follow-up Data According to the MYD88 Mutation

Characteristic	Total	MYD88		P Value ^a
		WT	L265P	
Patients	58 (100)	24 (41)	34 (59)	
Age, median (range), y	79 (50-96)	72.5 (50-86)	83.8 (50-96)	.006
Sex, No. (%)				
Male	24 (41)	10 (42)	14 (41)	.97
Female	34 (59)	14 (58)	20 (59)	
Location, No. (%)				
Lower extremity	44 (76)	14 (58)	30 (88)	.008
Elsewhere	14 (24)	10 (43)	4 (12)	
Lesions, No. (%) ^b				
1	17 (30)	9 (41)	8 (24)	.17
>1	39 (70)	13 (59)	26 (76)	
TNM category, No. (%)				
T1	20 (34)	11 (46)	9 (26)	.12
T2	26 (45)	7 (29)	19 (56)	
T3	12 (21)	6 (25)	6 (18)	
Therapy (at any time), No. (%)				
Rituximab with polychemotherapy ^c	34 (59)	15 (62)	19 (56)	.61
Other regimen ^d	24 (41)	9 (38)	15 (44)	
Outcome, No. (%)				
Complete response	42 (72)	19 (79)	23 (68)	.33
Cutaneous relapse ^e	24 (57)	10 (53)	14 (61)	.59
Extracutaneous progression	21 (36)	9 (37)	12 (36)	.93
Status, No. (%)				
Alive				
Disease free	17 (29)	10 (42)	7 (21)	.12
With disease	11 (19)	6 (25)	5 (15)	
Status unknown	1 (2)	1 (4)	0	
Died				
Lymphoma	19 (33)	5 (21)	14 (41)	.12
Other cause	10 (17)	2 (8)	8 (23)	
Specific survival rates, y, %				
3	74.0	85.4	65.7	.03 ^f
5	64.2	71.7	60.2	
Overall survival rates, y, %				
3	66.0	81.3	55.8	.002 ^f
5	51.8	62.6	38.4	

Abbreviation: WT, wild-type.

^a Indicates the difference between patients exhibiting MYD88 WT and those exhibiting MYD88 L265P.

^b Data were missing in 2 cases (0.03%).

^c Polychemotherapy with or without anthracycline.

^d Including polychemotherapy with or without anthracycline, but without rituximab.

^e Relapses were considered only in patients who achieved complete response (42 cases).

^f P values correspond to the comparison of survival curves.

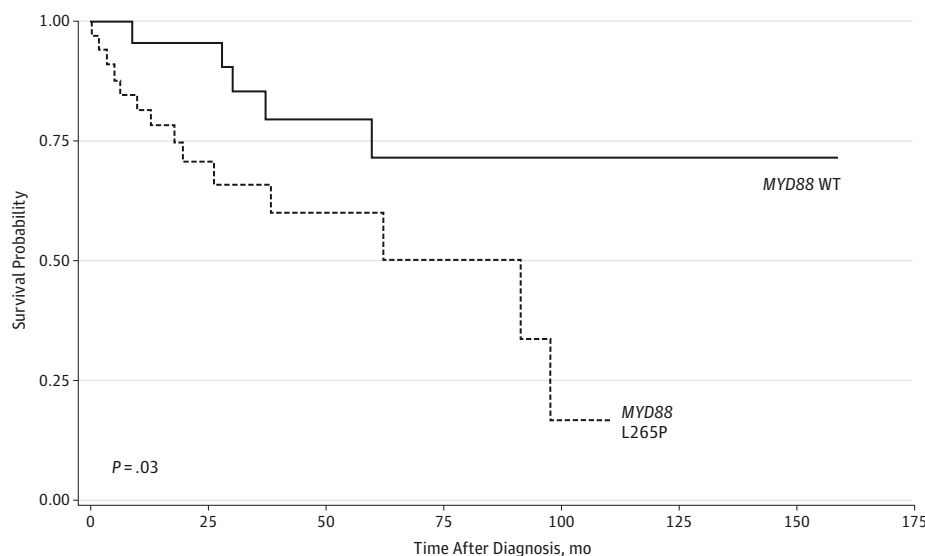
Specific Survival Analysis

Patients harboring the MYD88 L265P mutation had 3- and 5-year-specific survival rates of 65.7% and 60.2% vs 85.4% and 71.7% in patients with WT lymphoma, respectively ($P = .03$) (Table and Figure 2). In univariate analysis, disease-related death was significantly associated with MYD88 mutation ($P = .03$) (Figure 2), location on the leg ($P = .02$), and multiple skin lesions (corresponding to T2 to T3 categories vs a single lesion corresponding to T1 category) ($P = .02$), whereas age and sex did not reach significance. Multivariate analysis systematically adjusted for age identified MYD88 mutation (odds ratio [OR], 3.01; 95% CI, 1.03-8.78; $P = .04$) and multiple skin lesions (OR, 5.12; 95% CI, 1.12-23.26; $P = .03$) as adverse prognostic factors, whereas location on the leg ($P = .25$) and age ($P = .13$) did not reach significance.

Observed or Overall Survival Analysis

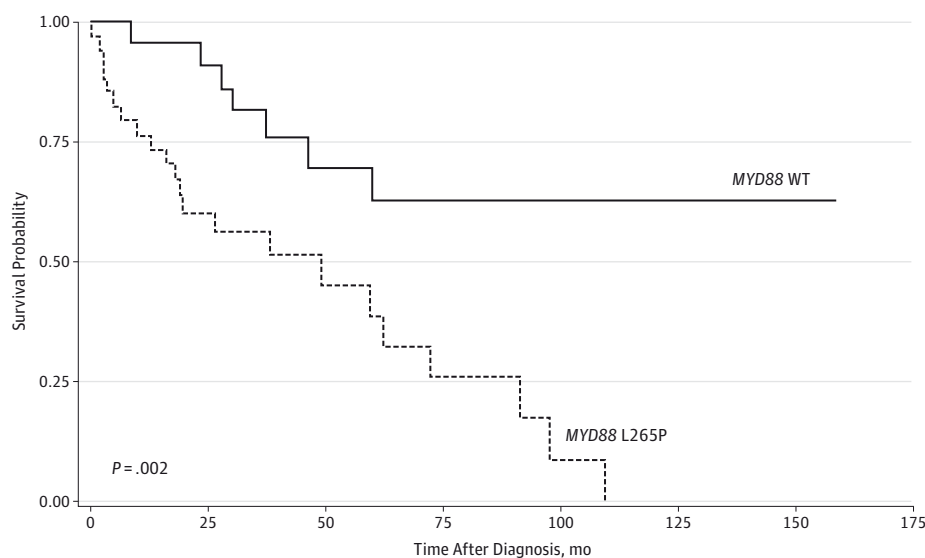
Patients harboring the MYD88 L265P mutation had 3- and 5-year overall survival rates of 55.8% and 38.4%, vs 81.3% and 62.6% in patients with WT lymphoma, respectively (Table and Figure 3). In univariate analysis, death was significantly associated with MYD88 mutation ($P = .002$), location on the leg ($P = .006$), and multiple skin lesions (corresponding to T2-T3 categories vs a single lesion corresponding to T1 category) ($P = .008$), whereas age and sex did not reach significance. In multivariate analysis systematically adjusted for age, MYD88 mutation (OR, 2.94; 95% CI, 1.18-7.30; $P = .02$) and multiple skin lesions (OR, 2.94; 95% CI, 1.03-9.26; $P = .04$) were identified as independent prognostic factors, whereas location on the leg ($P = .23$) and age ($P = .79$) did not reach significance.

Figure 2. Specific Survival of 58 Patients With Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg-Type According to the *MYD88* Mutation



The *MYD88* mutation was not present in 24 patients and was present in 34 patients. The global difference between the curves was significant ($P = .03$). WT indicates wild type.

Figure 3. Observed Overall Survival of 58 Patients With Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg-Type According to the *MYD88* Mutation



The *MYD88* mutation was not present in 24 patients and was present in 34 patients. The global difference between the curves was significant ($P = .002$). WT indicates wild type.

Discussion

The present study shows that the *MYD88* L265P oncogenic mutation indicates a poorer outcome in a specific group of patients with PCLBCL-LT and confirms its high prevalence (59%). To our knowledge, this is the largest study to date evaluating *MYD88* status in PCLBCL-LT.

The rate of *MYD88* mutation in PCLBCL-LT may have been decreased by DNA degradation in specimens from different sources with various fixation procedures and sample storage

conditions. In view of their clinical effect, the results of the present study required the development of an allele-specific TaqMan PCR assay targeting the L265P mutation, because Sanger sequencing was contributive in only 52% of the specimens. Use of an allele-specific TaqMan PCR resulted in efficient analysis of 58 of 61 samples (95%); moreover, the mutation was detected by the TaqMan assay in 4 patients interpreted as harboring the WT allele in Sanger sequencing.

Compared with the levels of *MYD88* mutation in PCLBCL-LT, lower rates have been reported^{8,15} in nodal ABC-DLBCL (17%-29%). In PCLBCL-LT, Koens et al¹⁰ reported a lower rate

(40%) in a series of 10 patients using Sanger sequencing. Our data are also in line with those obtained in Waldenström macroglobulinemia showing higher rates of detection when using a real-time PCR-based technique such as allele-specific PCR or high-resolution melting analysis for detection of the *MYD88* L265P mutation.^{16,17} The increased rate of the *MYD88* mutation in PCLBCL-LT is similar to rates observed in immune-privileged site-associated DLBCL, such as in the primary central nervous system and testis, where *MYD88* mutation has been reported¹⁵ with high frequencies of 75% and 71%, respectively. We can presume that PCLBCL-LT and central nervous system and testis DLBCL, ABC-type, may represent a distinct group of lymphomas driven by similar or equivalent oncogenic hits. Frequent involvement of the testis and central nervous system in PCLBCL-LT has been described.^{18,19}

To our knowledge, the present study is the first to demonstrate an association between *MYD88* mutation, older age, and location on the leg. Moreover, we were able to demonstrate a prognostic effect of *MYD88* mutation with a 3-year survival rate of 65.7% in patients with *MYD88* mutated tumors compared with 85.4% in those with WT tumors ($P = .02$) (Figure 3). Multivariate analysis considering either specific survival or overall survival showed that *MYD88* L265P mutation was an independent prognostic factor ($P = .04$ and $P = .02$, respectively), with systematic adjustment for age.

Nevertheless, elderly patients harboring *MYD88* mutation have a poorer outcome and may benefit from personalized medicine, especially targeted therapies, at the time of re-

lapse after conventional therapies. Mutation of *MYD88* predicts a poorer outcome considering *MYD88* signaling and nuclear factor- κ B pathway activation as actionable targets. Therapeutic strategies targeting either B-cell receptor signaling (as ibrutinib, the Bruton tyrosine kinase inhibitor, or fostamatinib targeting the spleen tyrosine kinase), or the interferon regulatory factor-4 and the transcription factor Spi-B (targeted by lenalidomide),²⁰ or NF- κ B proteasome inhibitor (bortezomib), or *MYD88* inhibitors,²¹ seem promising in ABC-DLBCL and especially in PCLBCL-LT. Because PCLBCL-LT is a rare disease, clinical trials including nodal and extranodal ABC-DLBCL cases are needed to evaluate responses rates to such targeted therapies according to putative predictive mutations, especially those of *MYD88* and other genes encoding for members of the B-cell receptor signaling pathway, such as *CARD11* or *CD79B*.⁵ Indeed, such ABC lymphomas usually carry several genetic alterations shown at nodal^{2,8} as well as extranodal sites for PCLBCL-LT^{10,11} or for central nervous system lymphoma.¹⁵

Conclusions

A prognostic effect of the *MYD88* L265P mutation identified in PCLBCL-LT on overall survival and a high rate (59%) of this mutation were observed in the present study. These findings support the hypothesis that this actionable oncogenic event has a major role among the genetic alterations of PCLBCL-LT.

ARTICLE INFORMATION

Accepted for Publication: April 8, 2014.

Published Online: July 23, 2014.

doi:10.1001/jamadermatol.2014.821.

Author Affiliations: Equipe d'accueil 2406, Histology and Molecular Pathology of Tumors, Universitaire Bordeaux, Bordeaux, France (Pham-Ledard, Beylot-Barry, Vergier, Cappellen, Merlio); Department of Dermatology, Centre Hospitalier Universitaire Bordeaux, Bordeaux, France (Pham-Ledard, Beylot-Barry); French Study Group for Cutaneous Lymphomas, France (Beylot-Barry, Petrella, Vergier, Merlio, Grange); Unité d'Aide Méthodologique, Hôpital Robert Debré, Reims, France (Barbe); Department of Clinical Research, Hôpital Maison Blanche, Centre Hospitalier Universitaire Reims, Reims, France (Leduc); Department of Pathology, Centre Hospitalier Universitaire Dijon, Dijon, France (Petrella); Department of Pathology, Centre Hospitalier Universitaire Bordeaux, Bordeaux, France (Vergier); Tumor Bank and Tumor Biology Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire Bordeaux, Bordeaux, France (Martinez, Cappellen, Merlio); Department of Dermatology, Hôpital Robert Debré, Centre Hospitalier Universitaire Reims, Reims, France (Grange).

Author Contributions: Drs Pham-Ledard and Grange had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study concept and design: Pham-Ledard, Beylot-Barry, Merlio, Grange.

Acquisition, analysis, or interpretation of data: All authors.

Drafting of the manuscript: Pham-Ledard, Cappellen, Merlio, Grange.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Pham-Ledard, Beylot-Barry, Barbe, Leduc, Petrella, Vergier, Martinez, Merlio, Grange.

Statistical analysis: Barbe, Leduc.

Obtained funding: Beylot-Barry.

Administrative, technical, or material support:

Beylot-Barry, Martinez, Cappellen.

Study supervision: Beylot-Barry, Vergier, Merlio, Grange.

Conflict of Interest Disclosures: None reported.

Funding/Support: This work is part of the REV-LEG Programme Hospitalier de la Recherche Clinique grant to Centre Hospitalier Universitaire Bordeaux number 2011-28, and received funding from Celgene. This study was designed based on a clinical study conducted on this series¹³ funded by the Société Française de Dermatologie. This work was conducted as part of the SIRIC BRIO program (Site de Recherche Intégrée sur le Cancer-Bordeaux Recherche Intégrée Oncologie), grant INCa-DGOS-Inserm 6046.

Role of the Sponsor: The sponsors had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; and decision to submit the manuscript for publication.

Additional Contributions: The following physicians and pathologists of the French Study Group for

Cutaneous Lymphomas provided data or samples: Pascal Joly, MD, PhD, and Philippe Courville, MD, PhD (Departments of Dermatology and Pathology, Hôpital Charles Nicolle, Centre Hospitalier Universitaire, Rouen, France); Martine Bagot, MD, PhD, and Caroline Ram-Wolff, MD, PhD (Departments of Dermatology and Pathology, Hôpital Saint-Louis, Paris, France); Stéphane Dalle, MD, PhD, and Brigitte Balme, MD, PhD (Departments of Dermatology and Pathology, Hôpital de l'Hôtel-Dieu, Lyon, France); Eve Maubec, MD, PhD (Department of Dermatology, Hôpital Bichat, Paris); Michel D'Incan, MD, PhD, and Pierre Dechelotte, MD, PhD (Departments of Dermatology and Pathology, Hotel-Dieu, Clermont-Ferrand, France); Sophie Dalac, MD, PhD (Department of Dermatology, Hôpital du Bocage, Dijon, France); Gaëlle Quéreux, MD, PhD (Department of Dermatology, Hôpital de l'Hôtel-Dieu, Nantes, France); and Olivier Dereure, MD, PhD, and Eric Frouin, MD, PhD (Department of Dermatology, Hôpital Avicenne, Bobigny, France). Martina Carlotti, PhD (Equipe d'accueil 2406, Histology and Molecular Pathology of Tumors, Universitaire Bordeaux, Bordeaux, France), Nathalie Carrere, PhD (Tumor Bank and Tumor Biology Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire Bordeaux), and Christine Alfaro, MS (Department of Dermatology, Centre Hospitalier Universitaire Bordeaux), provided advice and help with acquiring and analyzing the data. No financial compensation was given. Most samples were collected through the Tumor Bank of Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux.

REFERENCES

1. Swerdlow SH. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: International Agency for Research in Cancer; 2008.
2. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011;43(9):830-837.
3. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(10):3879-3884.
4. Zhang J, Grubor V, Love CL, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(4):1398-1403.
5. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88-92.
6. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*. 2008;319(5870):1676-1679.
7. Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- κ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009;459(7247):717-721.
8. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470(7332):115-119.
9. Hoefnagel JJ, Dijkman R, Basso K, et al. Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Blood*. 2005;105(9):3671-3678.
10. Koens L, Zoutman WH, Ngarmliertsirichai P, et al. Nuclear factor- κ B pathway-activating gene aberrancies in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol*. 2014;134(1):290-292.
11. Pham-Ledard A, Prochazkova-Carlotti M, Andrique L, et al. Multiple genetic alterations in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type support a common lymphomagenesis with activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2014;27(3):402-411.
12. Pham-Ledard A, Cappellen D, Martinez F, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio JP. MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol*. 2012;132(8):2118-2120.
13. Grange F, Joly P, Barbe C, et al. Improvement of survival in patients with primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type, in France. *JAMA Dermatol*. 2014;150(5):535-541.
14. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005;105(10):3768-3785.
15. Kraan W, Horlings HM, van Keimpema M, et al. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer J*. 2013;3:e139. doi:10.1038/bcj.2013.28.
16. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 (L265P) somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia and related lymphoid neoplasms. *Blood*. 2013;121(13):2522-2528.
17. Wang CZ, Lin J, Qian J, et al. Development of high-resolution melting analysis for the detection of the MYD88 L265P mutation. *Clin Biochem*. 2013;46(4-5):385-387.
18. Bekkenk MW, Postma TJ, Meijer CJ, Willemze R. Frequency of central nervous system involvement in primary cutaneous B-cell lymphoma. *Cancer*. 2000;89(4):913-919.
19. Grange F, Beylot-Barry M, Courville P, et al. Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type: clinicopathologic features and prognostic analysis in 60 cases. *Arch Dermatol*. 2007;143(9):1144-1150.
20. Yang Y, Shaffer AL III, Emre NCT, et al. Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2012;21(6):723-737.
21. Loiarro M, Ruggiero V, Sette C. Targeting the Toll-like receptor/interleukin 1 receptor pathway in human diseases: rational design of MyD88 inhibitors. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013;13(2):222-226.

B. Deuxième partie: étude en FISH des anomalies génétiques associées aux lymphomes B diffus à grandes cellules de type jambe.

1. Contexte scientifique

Parallèlement aux travaux sur le gène *MYD88*, l'étude des translocations classiquement associées aux lymphomes B ganglionnaires semblait logique, étant donné que nous souhaitions caractériser au mieux les aspects génétiques associées aux LCBDGC-TJ. Dans les lymphomes cutanés B, les travaux réalisés jusqu'en 2011 montraient que malgré des similitudes morphologiques et phénotypiques, les translocations classiquement associées aux lymphomes ganglionnaires impliquant par exemple les oncogènes *BCL2* ou *MALT1* dans les lymphomes folliculaires ou du MALT, respectivement, sont absentes ou très rares. Cependant, des réarrangements impliquant des oncogènes "classiques" comme *BCL6* et *MYC* avaient été identifiées au sein des LCBDGC-TJ, de même que la délétion du locus 9p21 provoquant une inactivation de *CDKN2A/p16*. Seule cette dernière anomalie avait été étudiée sur une série importante de malades, ayant d'ailleurs permis d'en montrer sa valeur pronostique. Ces publications nous ont donc incités à rechercher ces translocations récurrentes sur une série monocentrique de malades, afin d'avoir une idée plus claire de leur prévalence, et éventuellement de leur influence pronostique.

2. Objectifs et méthodologie

Cette étude a été effectuée sur une série de 23 patients pour lesquels toutes les données cliniques, évolutives et histologiques étaient disponibles. Tous ces patients ont été testés pour la mutation *MYD88*, les translocations de *BCL2- BCL6 -MYC*, pour la délétion du locus 9p21 (en FISH), et pour le locus 6q21 encodant *BLIMP1*. L'objectif était non seulement d'avoir la prévalence de chaque anomalie, mais aussi de pouvoir observer des anomalies associées entre elles. Chez les patients porteurs de plusieurs altérations en FISH, une caractérisation des noyaux atteints a été effectuée grâce à une technique d'hybridation séquentielle en FISH (jusqu'à 6 sondes) et relocalisation de la zone d'intérêt pour observation et numérisation. La question posée était celle de l'hétérogénéité tumorale qui pouvait être en partie explorée de cette manière.

3. Résultats et conclusion

De manière surprenante pour un lymphome cutané B, **96% des cas étaient porteurs d'au moins une anomalie parmi celles étudiées, et plus de 50% présentaient au moins deux anomalies.** Après la mutation de *MYD88*, l'anomalie la plus fréquente (61%) était le

réarrangement de *BCL6* (6/23). Un réarrangement de *MYC* était observé dans tout de même 3 cas, mais l'expression en immunohistochimie était en revanche fréquente (55% des cas). L'étude de FISH séquentielle montrait une **homogénéité tumorale**, avec **des cellules porteuses de plusieurs altérations**.

Tous ces éléments génétiques pouvaient rapprocher le LCBDGC-TJ aux LBDGC de type ABC-like, puisque les mêmes anomalies avaient été rapportées dans ces lymphomes et préjuger d'une lymphomagenèse proche. Cependant, la fréquence plus grande de la mutation *MYD88* dans les LCBDGC-TJ est une caractéristique propre aux cutanés (60-70% versus 30-40% dans les LBDGC-ABC). Cette fréquence/prévalence est également observée dans d'autres LBDGC extra ganglionnaires: le LBDGC du système nerveux central (75%) ou du testicule (71%).

4. Publication: 1 article

Pham-Ledard A., Prochazkova-Carlotti M., Andrique L., Cappellen D., Vergier B., Martinez F., Grange F., Petrella T., Beylot-Barry M., et Merlio JP.

Multiple genetic alteration in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type support a common lymphomagenesis with activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma.

Modern Pathology (2013). 27(3):402-11

Multiple genetic alterations in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type support a common lymphomagenesis with activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma

Anne Pham-Ledard^{1,2}, Martina Prochazkova-Carlotti¹, Laetitia Andrique¹, David Cappellen^{1,3}, Béatrice Vergier⁴, Fabian Martinez³, Florent Grange⁵, Tony Petrella⁶, Marie Beylot-Barry^{1,2} and Jean-Philippe Merlio^{1,3}

¹EA2406 Histology and Molecular Pathology of Tumors, University of Bordeaux, Bordeaux, France;

²Dermatology Department, CHU Bordeaux, Bordeaux, France; ³Tumor Bank and Tumor Biology Laboratory, CHU Bordeaux, Bordeaux, France; ⁴Pathology Department, CHU Bordeaux, Bordeaux, France; ⁵Dermatology Department, CHU Reims, Reims, France and ⁶Pathology Department, CHU Dijon, Dijon, France

Primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type has been individualized from nodal diffuse large B-cell lymphoma. The objective of this study was to screen primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type for genetic alterations recently described in nodal diffuse large B-cell lymphoma. Skin biopsies from 23 patients were analyzed for IRF4, BCL2, BCL6, and MYC expression. FISH testing was performed for BCL2, BCL6, MYC with separation probes and for CDKN2A and PRDM1/BLIMP1 deletion. Multiple sequential FISH analyses with up to six probes were performed to define samples with multiple cytogenetic alterations. MYD88 mutations were studied by Sanger sequencing. All cases but one displayed at least one genetic alteration (96%). Nine patients exhibited a single genetic mutation and 12 combined several alterations (52%). We observed a split for BCL2, BCL6, or MYC in 1/23, 6/23, and 3/23 of cases, respectively. No double-hit lymphoma was observed. CDKN2A deletion was detected by FISH in only 5/23 cases. BLIMP1 and/or 6q deletion was observed at a higher rate in 10/20 of cases. No correlation between rearrangement and immunohistochemical expression was found for BCL2 or MYC. FISH tracking of sequential hybridizations showed that several alterations were carried by the same nuclei. The p.L265P MYD88 mutation was found in 11/18 (61%) of cases. Contrary to most cutaneous lymphomas that rarely harbor primary genetic alteration of their nodal histological equivalent, primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type seems to be a ‘cutaneous counterpart’ of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma with a similar cytogenetic profile and a high rate of MYD88 oncogenic L265P mutation. This also suggests a common lymphomagenesis with NF- κ B activation, strong IRF4 expression and terminal B-cell differentiation blockage. Our data support the use of therapies targeting NF- κ B, as most patients displayed disease progression and resistance to conventional therapies.

Modern Pathology advance online publication, 13 September 2013; doi:10.1038/modpathol.2013.156

Keywords: BCL2; BCL6; diffuse large B-cell lymphoma; MYC; MYD88; NF- κ B; primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type

Primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type has been individualized in the WHO classification as an aggressive disease involving preferentially the

leg(s) with rapidly growing tumor(s) in elderly and a 5-year survival around 40%.^{1–4} It is made of diffuse and confluent sheets of monotonous large B cells in the dermis and frequent infiltration of the subcutaneous tissue. Tumor cells are characterized by a high expression of BCL2, IRF4/MUM1 and FOXP1 proteins with an aberrant expression of the germinal-center BCL6 protein.^{5,6} At diagnosis, age, leg involvement, extent of skin disease, and CDKN2A (P16) inactivation have been found as predictive for progression and death.^{3,6–8}

Correspondence: Professor J-P Merlio, MD, PhD, EA 2406 Histology and Molecular Pathology of Tumors, University of Bordeaux Bat. 3B, 2ème étage, Zone Nord 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

E-mail: jp.merlio@u-bordeaux2.fr

Received 22 April 2013; revised 12 July 2013; accepted 14 July 2013; published online 13 September 2013

Contrary to nodal diffuse large B-cell lymphomas, few studies have identified molecular pathways contributing to primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type oncogenesis and from what stage of B-cell differentiation such lymphoma arise. In nodal diffuse large B-cell lymphomas, gene expression profiling has identified two main signatures corresponding to the differentiation stage of the cell of origin: germinal center or post-germinal-center activated B cell.^{9,10} Gene expression profiling has suggested that primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type displays the profile of activated B-cell subtype while primary cutaneous follicle center lymphoma is similar to the germinal-center category.¹¹ Several immunohistochemical studies of nodal diffuse large B-cell lymphoma have shown that gene expression profiling categorization could be substituted by several appropriate algorithms with a hierarchical set of monoclonal antibodies (IRF4/MUM1, BCL6 and CD10).^{12,13} In primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type, the strong expression of BCL2, FOXP1, and IRF4/MUM1 has also been suggestive of activation of the NF- κ B signaling pathway in the absence of *IRF4/MUM1* rearrangement.^{3,5,14}

Indeed, activated B-cell-like nodal diffuse large B-cell lymphoma have been recently shown to harbor several genetic mutations involving either the B-cell receptor signaling pathway (*CD79B*) or *MYD88*, a gene encoding a signaling protein of the Toll-like receptor pathway.^{15,16} Mutations of *TNFAIP3/A20* and *CARD11* alterations also contribute to NF- κ B pathway constitutive activation transactivating IRF4 in a positive feedback oncogenic loop.^{17–19} Moreover, *BLIMP1/PRDM1* inactivation by genetic loss or mutation was shown to disrupt post-germinal-center terminal B-cell differentiation.^{20,21} We recently reported that primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type harbor at a striking elevated level (69%) a unique driver mutation (L265P) of *MYD88*²² previously identified both at the genetic and functional level in 29% of activated B-cell-like nodal diffuse large B-cell lymphoma.¹⁶

Besides deciphering lymphomagenesis, the knowledge of oncogenic mutations can guide therapeutic strategies targeting BCR signaling and IRF4.¹⁹ So far, a combination of polychemotherapy adapted to the age of patients with rituximab appears as the better first-line therapy in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type, as in nodal diffuse large B-cell lymphoma.^{23,24} However, skin relapses and extra-cutaneous spreading occur in about half of the patients, and the 5-year overall survival in only 40%.^{3,6} In nodal diffuse large B-cell lymphoma, the activated B-cell-like subtype is also characterized by a poorer response to anthracyclin-based chemotherapy than the germinal-center-like type.^{10,13} Moreover, *BCL2*, *BCL6*, *MYC* rearrangements, or *CDKN2A* (P16) deletion have been shown associated with a worse prognosis in patients with

nodal diffuse large B-cell lymphoma treated with polychemotherapy plus rituximab.^{25–31} The presence of such chromosomal rearrangements has also been reported in cutaneous B-cell lymphoma series including only very few cases of primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type.^{32,33} This prompted us to investigate the status of *BCL2*, *MYC*, *BCL6*, *CDKN2A*, and *BLIMP1* loci using FISH in our homogeneous series and to determine their prognosis impact. In cases harboring multiple gene loci alterations, we set up an original sequential hybridization procedure to determine if tumor cells combine several cytogenetic abnormalities and to look for clonal heterogeneity.

Materials and methods

Patient Selection

Cases were retrieved retrospectively from the University Hospital of Bordeaux, France ($n=15$) and from the French study group of cutaneous lymphomas ($n=8$), from 1992 to 2012. The study was performed after patient information and registration of absence of opposition according to the guidelines of the French Bioethical law for non-interventional research studies and to the Declaration of Helsinki principles. The diagnosis was confirmed by review of cases by pathologists and physicians of the French Group of Cutaneous Lymphoma, according to the WHO-EORTC classification.^{2,4} Patients with formalin-fixed paraffin-embedded skin tissue available for FISH study and giving informative FISH results were included ($n=23$). Out of these 23 patients, 18 had already been included in previous studies about primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type by our team or by the French study group of cutaneous lymphoma.^{3,14,22}

Histological and Immunohistochemistry Data

Sections (3- μ m thick) of formalin-fixed paraffin-embedded skin biopsies were stained with BCL2 (clone 124, DAKO, Les Ulis, France), IRF4/MUM1 (clone mum1p, DAKO), BCL6 (clone PGB6P, DAKO), CD10 (clone 56C6, NOVOCASTRA, Leica, Nanterre, France), and c-MYC (clone Y69, EPITOMICS, Burlingame, CA). The cutoff for tumor positivity was set at 30% of tumor cells staining for each antibody,^{5,12,34} except for c-MYC (nuclear staining in >50% of tumor cells).³⁵ All cases were scored without knowledge of FISH results or patient outcome.

Interphase FISH Analysis

Tissue sections (4- μ m thick) were prepared from formalin-fixed paraffin-embedded skin tumoral biopsies. After dewaxing and rehydration of tissue sections, samples were pretreated by incubating samples 10 min in a pre-treatment (Histology FISH

accessory kit DAKO) prewarmed at 95 °C, then were left to cool at ambient temperature during 15 min, and washed 3 min with distilled water. Then, slides were incubated 15 min with protease solution (VYSIS, ABBOTT molecular, Rungis, France) at 37 °C, then washed two times with distilled water. Thereafter, samples were dehydrated by ethanol series and dried at ambient temperature. Hybridizations were conducted with labeled probes for *BCL2*, *MYC*, *BCL6* (FISH DNA split signal, DAKO), and *CDKN2A* (LSI p16 (9p21)/CEP9 Dual Color Probe, Vysis, ABBOTT Molecular) to study the occurrence of alterations affecting these loci. Cases showing a breakpoint at the *MYC* locus were also investigated with the LSI IGH-MYC-CEP8 tricolor FISH-probe kit (Vysis, ABBOTT Molecular).

We also investigate the presence of a *BLIMP1* locus deletion by FISH using the following BAC probes: the 6q21 probe for the *BLIMP1* locus RP-101M23 was labeled with SpectrumRed, the 6q25 RP-11-589G2 labeled with SpectrumGold as control probe on 6q, and the 6p25 CTD-2308G5 labeled with SpectrumGreen as control probe on 6p.

After post-hybridization washing, slides were counterstained with 4',6-diamidino 2-phenylindole. For *BCL2*, *BCL6*, and *MYC* analysis, cells harboring a gene breakpoint, one yellow fusion (F) signal in addition to one red and one green signals (split) were observed while the FISH pattern was 2F signal in normal nuclei. Minor breakpoints in the *BCL2* or *MYC* gene locus could also provide other patterns with Red or Green extra-signals (2F-2G-1R or 2F-1G-2R), as well as complex patterns with one or more rearranged allele in a polyploid sample. Copy number variation were also taken into account, such as extracopy (more than 2F pattern), and deletion (less than 2F pattern). For *CDKN2A* and *BLIMP1*, the ratio between locus-specific and centromere for *CDKN2A* or control probes for *BLIMP1* signals was recorded in individual cells. For *BLIMP1*, 'interstitial deletion' was recorded when only the *BLIMP1* locus signal was lacking, and '6q deletion' when both *BLIMP1* locus and 6q25 signals were lacking. At least 10 high-power fields ($\times 63$ objective) of tumor areas were analyzed and scoring was determined independently on 100 non-overlapped nuclei by two observers (AP-L and MP-C). Positivity was determined above a 5% threshold for split signal or separation probes and 15% threshold for deletion, gain, or amplification.

Sequential hybridization on the Same Slide with Different Probes

To show multiple chromosomal alterations in the same tumor, we developed an original FISH strategy with sequential hybridizations. After the first FISH analysis, the coverslip was removed and the slide washed during 5 min in phosphate buffer saline. After dehydration in alcohol series, the slide was dried at ambient temperature and denatured during

5 min in formamide 70%/2 \times SCC warmed at 70 °C, and again dehydrated. The further probes were denatured in a hot water bath. This procedure of sequential hybridizations could be generally conducted at least six times on the same slide, or stopped in case of deterioration of nucleus morphology at 4',6-diamidino 2-phenylindole staining. Controls between sequential steps showed the absence of remaining signals of the previous hybridization.

Relocalization of Nucleus in Samples Harboring Multiple Gene Alterations

Sequential hybridizations were analyzed with a fluorescence microscope (Imager Z2, ZEISS) and software (Metasystems, Altlussheim, Germany) permitting to relocalize a tumor area on a same slide by the use of a motorized microscope stage (Marzhauser, Wetzlar, Germany). Moreover for each genetic alteration, the percentage of cells with an aberrant profile was recorded and compared with other genes data.

MYD88 Analysis

MYD88 analysis was performed on matched tumoral and constitutional DNA as described before.²²

Statistical Analysis

Disease-specific survival was calculated from the date of diagnosis to the date of disease-related death or last follow-up without event. Overall survival was determined from the date of diagnosis to the date of death of any cause. Disease-free survival was calculated as the time relapsed from diagnosis date to the date of recurrence or death. Potential prognosis factors examined were patient's age (dichotomized in two classes: >75 years *vs* <75 years) and gender, extent of cutaneous involvement according to TNM classification, site of cutaneous lesions (leg *versus* non-leg localization), presence of an ulceration, first-line therapy (polychemotherapy with rituximab *versus* other therapy), and presence of a FISH abnormality or *MYD88* mutation. Survival curves were plotted using the Kaplan–Meier method and compared using the log-rank test for each prognosis factor (univariate analysis). Statistical analysis was performed using MedCalc software, version 12.4.0 (<http://www.medcalc.org>).

Results

The main clinical characteristics of patients at diagnosis, follow-up, immunohistochemical, and FISH results are summarized in Tables 1 and 2.

Clinical Data at Diagnosis

Twenty-three patients with primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type consisted of 13 women

Table 1 Clinical characteristics and follow-up of patients with primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type included in the study

No. of case	Gender/age	Site	Ulceration	TNM	Therapy	CR	Skin relapse (months)	Extracutaneous progression (months, site)	Final status (months of follow-up)
1	M/59	Leg	No	T2N0M0	RT	No	-	Yes (8, cerebral)	DD (13)
2	M/72	Arm	No	T2N0M0	RT	Yes	Yes (10)	Yes (24, digestive)	DD(26)
3	F/88	Arm	Yes	T2N0M0	PC	No	—	No	DD (5)
4	F/88	Leg	No	T2aN0M0	R-PC + RT	Yes	Yes (32)	No	DD (46)
5	F/83	Trunk	No	T2cN0M0	R-PC	Yes	No	No	CR (17)
6	M/62	Leg	No	T2bN0M0	R-PC	Yes	No	No	CR (52)
7	M/64	Leg	NA	T2xN0M0	Surgery	No	—	Yes (6, liver)	DD (8)
8	F/83	Leg	No	T1aN0M0	Surgery	Yes	Yes(38)	No	DA (41)
9	F/83	All/Leg	NA	T3bN0M0	RT	No	—	Yes (2, bone)	DD (5)
10	F/88	Leg	No	T1aN0M0	PC + RT	Yes	Yes(34)	Yes (37, cerebral)	DD (39)
11	M/81	Head	NA	T1xN0M0	RT	Yes	Yes (4)	No	DD (45)
12	F/71	Leg	NA	T1xN0M0	PC + RT	Yes	Yes (1)	Yes (22, breast)	DD (37)
13	F/77	Leg	NA	T2aN0M0	PC + RT	Yes	Yes (15)	No	DD (172)
14	F/86	Leg	NA	T2xN0M0	RT	Yes	Yes (4)	No	CR (104)
15	F/63	Leg	No	T2bN0M0	R-PC	Yes	No	No	CR (28)
16	M/67	Head	Yes	T2xN0M0	PC	Yes	NA	NA	CR (2)
17	F/71	Leg	NA	T1xN0M0	PC	Yes	Yes(22)	Yes (55, cerebral)	DD (61)
18	F/81	Trunk	No	T3aN0M1	R-PC	Yes	Yes (9)	Yes (0, bone)	DD (16)
19	F/75	Leg	No	T1xN1M0	R-PC	Yes	Yes (8)	Yes (0, node)	DD (68)
20	F/83	Leg	Yes	T2bN1M0	R-PC	No	—	Yes (0, node)	DD (11)
21	M/75	Arm	No	T1bN1M0	R-PC	Yes	Yes (14)	Yes(0, node)	DD(18)
22	M/90	Leg	Yes	T2bN0M0	R-PC	Yes	Yes (10)		AWD (14)
23	M/78	All/Leg	Yes	T3bN0M0	R-PC	No	—	No	DD (2)

AWD: alive with disease; CR: complete remission; DA: death another cause; DD: death of disease; NA: not available; PC: polychemotherapy; R-PC: Rituximab + polychemotherapy; RT: radiotherapy.

and 10 men, with a median age of 78 years (range, 59–90 years; Table 1). Seven patients had a solitary lesion classed T1, 13 were T2 (regional skin involvement) and 3 had generalized skin involvement (T3). Four patients had extracutaneous involvement at initial staging but were primarily referred to our dermatological department for primary cutaneous presentation and initial biopsy specimens with a diagnosis of large B-cell lymphoma, leg type: 3 had limb tumor and regional draining lymph node spreading (cases 19–20–21), one had a skin tumor of the trunk with contiguous costal involvement (case 18). The most frequently involved localization was the leg (16 out of 23, 70%), associated with generalized skin involvement in two cases (9%), 2 patients had head and neck lesion (9%), 3 patients had arm involvement (13%), and 2 patients had lesion on the trunk (4%). Six patients had an ulcerated skin lesion out of 18 with such available information.

First-Line Therapy, Follow-Up, Relapse Rate

Combination of systemic polychemotherapy with rituximab was the most common first-line treatment ($n=10$, 43%; Table 1). Six patients received systemic chemotherapy alone (26%), followed by adjuvant radiotherapy in three cases. Five patients were exclusively treated by radiotherapy (22%), and two patients had only surgery (9%). The mean and median follow-up was 36 and 26 months, respec-

tively (range 2–172 months). Seventeen patients (74%) were followed until death. Complete remission was obtained for 17 patients (74%). Patients without complete response ($n=6$) had disease progression (at the skin level only in one case or extracutaneous in five cases), whichever first-line therapy. Among the 17 patients with complete response, 13 (76%) experienced at least one cutaneous relapse. The mean and median delay for cutaneous relapse was 15 and 14 months after complete remission, respectively (range 1–38 months). Eleven patients developed extracutaneous disease during follow-up (47%), with cerebral ($n=3$), node ($n=2$), bone ($n=2$), breast ($n=1$), digestive ($n=1$), pericardia ($n=1$), and liver ($n=1$) involvement. The mean and median delay for the development of extracutaneous progression was 14 and 6 months after diagnosis, respectively (range 0–55 months). At the final point, 5 patients were alive in complete remission, one patient was alive with disease, and 16 patients died of lymphoma (median delay of 39 months), whereas one died of another disease.

Immunohistochemical and Genetic Data

We observed an abnormal genetic profile for at least one gene studied among *BCL2*, *BCL6*, *MYC*, *CDKN2A*, *BLIMP1* or *MYD88* in 22 out of 23 patients (96%) (Table 2, Figures 1 and 2). The most frequent

Table 2 Immunohistochemistry and genetic results of patients with primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type included in the study

N°	IHC MUM1/BCL2 BCL6/CD10/MYC	FISH BCL2	FISH BCL6	FISH MYC	FISH CDKN2A	FISH BLIMP1	MYD88
1	-/+ /-/-/-	N	N	Split (15%)	Del (15%)	NI	L265P
2	+/+/+/-/ND	N	extra	N	N	NI	L265P
3	-/+ /-/-/IN	N	N	N	N	NI	L265P
4	+/+/+/-/+	Extra (70%)	Extra (68%)	N	N	Del 6q (78%)	L265P
5	+/+/+/-/ND	N	N	N	N	Del 6q	L265P
6	+/+/+/-/-	N	Split (75%)	N	Del (75%)	N	N
7	+/+/+/ND/+	N	N	N	N	N	NI
8	+/+/+/-/+	Extra (80%)	Split + extra (85%)	N	Extra (80%)	Del 6q (85%)	N
9	-/+ /+/ND/+	N	N	Del	N	Del	IN
10	+/+/+/-/IN	N	N	N	N	NI	L265P
11	+/+/+/-/+	N	Split + del (80%)	N	N	N	N
12	+/+/ND/ND/ND	N	N	Split (90%)	Del (90%)	NA	NA
13	+/+/ND/ND	N	N	N	N	Del (10%)	N
14	+/+/ND/ND/+	N	Extra (75%)	Split (80%)	N	N	NI
15	+/+/+/-/-	N	N	N	N	N	L265P
16	+/+/+/ND/+	Split (75%)	N	N	Del (95%)	N	NI
17	+/+/ND/ND/+	Extra (75%)	Extra (72%)	N	Del (60%)	Del 6q + extra (70%)	L265P
18	+/+/+/+/+	N	Split (20%)	N	N	Del (20%)	L265P
19	+/+/+/-/+	N	N	N	N	Del (85%)	L265P
20	+/+/+/-/-	N	Split (47%)	N	N	N	N
21	+/+/+/-/-	N	N	N	N	Del (77%)	N
22	+/+/+/-/ND	N	Split (90%)	N	N	Del 6q (65%)	N
23	+/+/-/+/+	N	N	N	N	Del (80%)	L265P

Del: deletion of the locus; Extra: extracopy of the locus; IHC: immunohistochemistry; N: normal; NA: not available; ND: not done; Neg: negative; NI: not interpretable.

findings were the p.L265P *MYD88* mutation (c.794 T>C) occurring in 11 out of 18 informative cases (61%) and the 6q deletions involving *BLIMP1* in 11 out of 18 informative cases (61%; interstitial deletion in five cases, 6q deletion including *BLIMP1* in six cases). *CDKN2A* (P16) deletion was observed in 5/23 cases (22%), either homozygous ($n=2$) or heterozygous ($n=3$). The presence of a *BCL6* breakpoint was also found in 6 out of 23 cases (26%) and the presence of normal *BCL6* locus extracopy in 5 out of 23 cases (22%). In 3 out of 23 (13%) cases, a *MYC* breakpoint was detected. These cases were further investigated for the *IGH-MYC* fusion, and fusion pattern suggestive for the t(8;14)(q24;q32) was observed in 2/3 cases. In one case only (1/23, 4%), a *BCL2* breakpoint was detected. There was no double- or triple-hit lymphoma for *BCL6*, *MYC* or *BCL2* breakpoints. Conversely, *CDKN2A* deletion was found associated together with either a *MYC* rearrangement (cases 1 and 12) or a *BCL6* rearrangement (case 6) or *BCL2* rearrangement (case 16) in the same patient. Extra copies of a genetic locus were frequently observed, 5/23 (22%) for *BCL2*, 5/23 (22%) for *BCL6*, and 1/23 (4%) for *CDKN2A*. Three patients displayed extra copies of more than two loci suggesting a global polyploidy (case 4, 8, and 17). Interestingly, *BCL6* expression observed in 15/19 cases (79%) was found correlated with the presence of a *BCL6* breakpoint. Indeed, 6 cases with a *BCL6* breakpoint and 2 cases with *BCL6* extracopy showed *BCL6* expression, out of 15 positive cases.

Alternatively, the four cases without *BCL6* expression displayed a normal *BCL6* FISH pattern. Such correlation was not found for the strong *BCL2* expression in all cases, with only one case with breakpoint (Table 2). No correlation was also found for *MYC* expression observed in 10/18 cases (55%), with only 2 of them exhibited a *MYC* breakpoint.

FISH Analysis: Multiple Hybridizations and Tracking of Nuclei on the Same Slide

In cases harboring several FISH abnormalities, we observed similar percentages of abnormal nuclei in the same tumor (Table 2). Such data strongly suggest that the same tumor nuclei harbored several genetic abnormalities. Sequential hybridization of different probes and tracking of multiple pathologic areas on the same slides were conducted in cases 1, 6, 8, and 12. In these samples, we observed that the same nuclei exhibited multiple gene abnormalities, as *BCL6* breakpoint and 6q deletion in case 8 (Figure 1a and b), *MYC* breakpoint and *CDKN2A* heterozygous deletion in case 12 (Figure 1c and d), *BCL6* breakpoint and *CDKN2A* homozygous deletion in case 6 (Figure 1e and f).

Statistical Analysis

Univariate analysis of disease-specific survival and overall survival showed that the presence of a

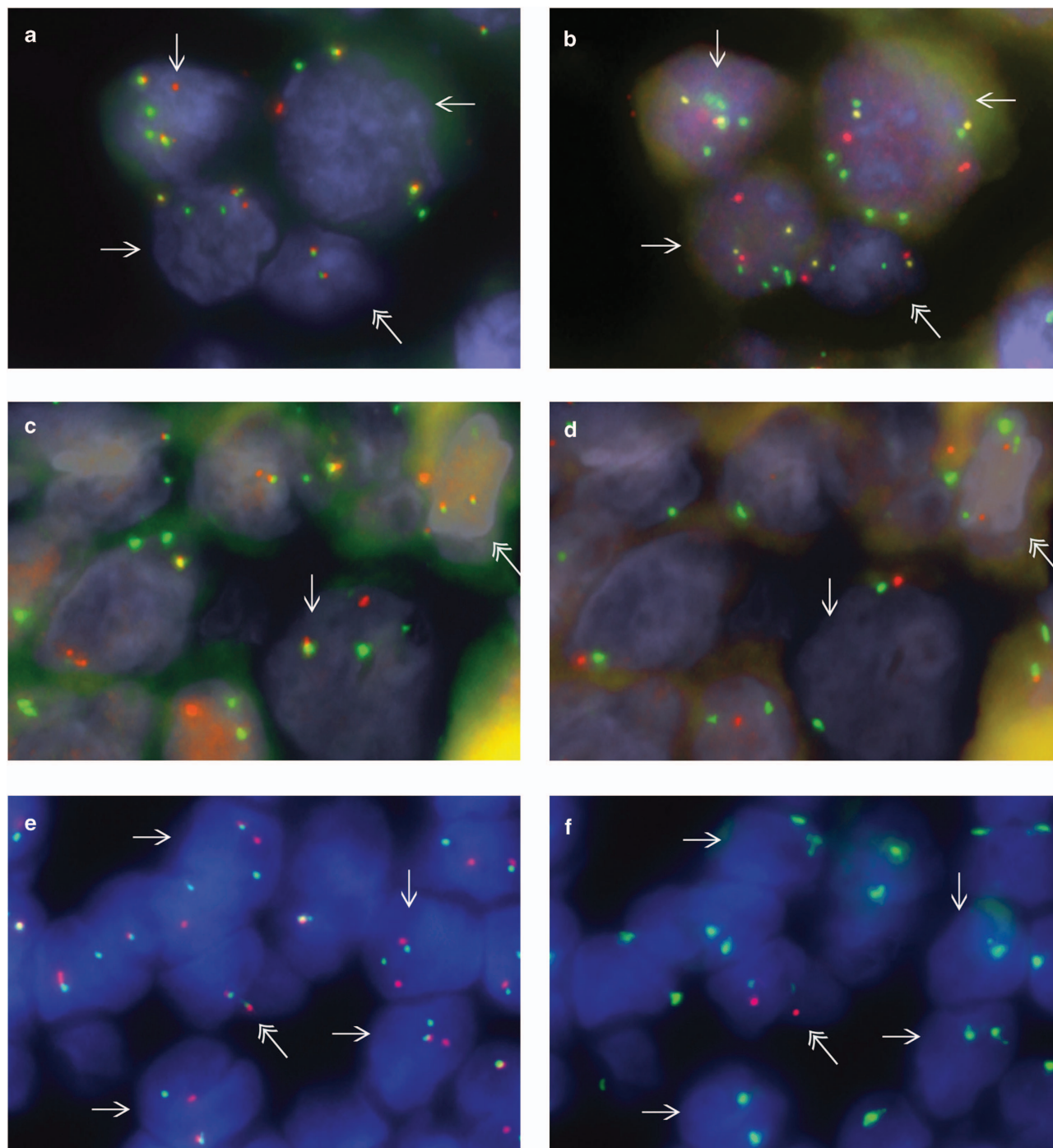


Figure 1 Sequential FISH with tracking of tumoral cells on skin sections shows that the same nuclei display several chromosomal abnormalities. (a, b) Tracking of FISH abnormalities of case 8 after sequential *BCL6* split probe hybridization (a) and after *BLIMP1* probe (6p Green-*BLIMP1* Red-6q Gold) hybridization (b). The abnormal nuclei (arrow) carry both a *BCL6* breakpoint (2Fusion (F)-1R-2Gr pattern on a) together with a *BLIMP1* deletion with polysomy (6Gr-2R-2Go on b). A normal nucleus (double arrow) shows a normal 2F pattern with *BCL6* probe (a) and a normal 2Gr-2R-2Go pattern with *BLIMP1* probe (b). (c, d) Tracking of FISH abnormalities of case 12 after sequential *MYC* split probe hybridization (c) and *CDKN2A* probe hybridization (d). (c) An abnormal nucleus (arrow) carries a *MYC* breakpoint (1F-2Gr-1R pattern). (d) The same nucleus (arrow) displays a *CDKN2A* heterozygous deletion (2Gr-1R pattern). A normal nucleus (double arrow) harbors a 2F pattern for *MYC* probe (c) and a 2Gr-2R pattern for *CDKN2A* (d). (e, f) Tracking of FISH abnormalities of case 6 after sequential *BCL6* split probe hybridization (e) and after *CDKN2A* probe hybridization (f). The abnormal nuclei (arrows) harbor a *BCL6* breakpoint (1F-1R-1Gr pattern) (e) and a homozygous *CDKN2A* deletion (2Gr-0R pattern) (f). A normal nucleus (double-arrow) harbors a 2F pattern for *BCL6* probe (e) and a 2Gr-2R pattern for *CDKN2A* probe (f).

cutaneous ulceration was related with death ($P = 0.0001$) (Figure 3). Gender, age, leg localization, T classification, and first-line therapy had no

significant effect. FISH abnormalities (*BCL2/BCL6/ MYC* break, *CDKN2A* deletion, and *BLIMP1* or 6q deletion) were not associated with death or relapse.

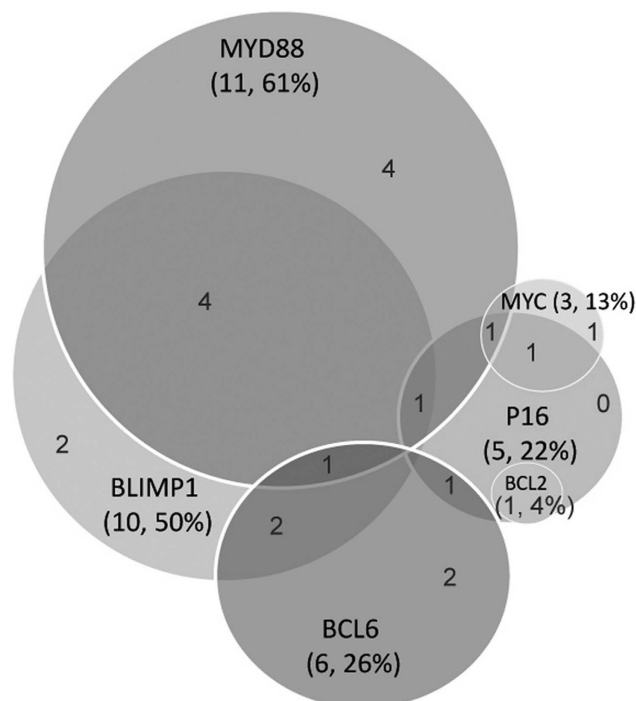


Figure 2 Overlap of *MYD88* mutation with other chromosomal alterations.

Although not significant in this small series ($P=0.15$), the presence of *MYD88* mutation tend toward a shorter survival (Figure 3).

Discussion

In this study, we investigated a series of 23 cutaneous large B-cell lymphoma, leg type for the occurrence of gene mutations and chromosomal rearrangements or deletions in gene loci recurrently involved in nodal diffuse large B-cell lymphoma. First, we observed a very frequent rate of genetic abnormalities in 22 out of 23 cases (96%). Second, these aberrations were the same as those reported in nodal-activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma: *MYD88* mutation (11/18; 61%); *BLIMP1* deletion (11/18; 61% cases); *BCL6* breakpoint (6/23; 26%); *CDKN2A* deletion (5/23; 22%); *MYC* breakpoint (3/23; 13%), and extra copies of several loci suggesting polyploidy. Moreover, our original FISH strategy with successive hybridization and tumor area tracking permitted us to establish that the same nuclei displayed several cytogenetic alterations.

Altogether, the cytogenetic alterations observed in our series bring primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type close to its activated B-cell nodal counterpart as no double-hit lymphoma was observed. For example, *BCL6* rearrangements were found in ~30% of nodal-activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma.^{26,27} The *BCL6* protein acts as transcriptional repressor, which appears to inhibit differentiation of germinal-center B cells toward

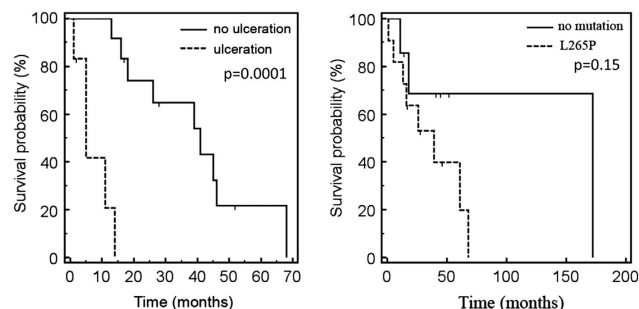


Figure 3 Overall survival according to the presence of ulceration ($P=0.0001$) or to the presence of the *MYD88* L265P-activating mutation ($P=0.15$).

plasma cells, thereby preventing the expression of *BLIMP1*.³⁶ We also found that ~50% of primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type carry a heterozygous deletion involving the *BLIMP1* locus, either as interstitial deletion (6q21) or terminal 6q deletion. The latter also encompass the 6q23 (*TNFAIP3/A20*) locus, which is known to be inactivated in ~30% of activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma.¹⁸ Our data would support that *BLIMP1* inactivation in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type blocks B-cell terminal differentiation like in activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma.^{21,37,38} Inactivation of *BLIMP1* gene also described in 53% of activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma would also contribute to the expression of both *IRF4/MUM1* and *BCL6* proteins, a frequent feature of primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type,^{5,14} which are normally exclusive during B-cell development.³⁹

The *MYC* oncogene can be activated through the t(8;14)(q24;q32), which is the hallmark of Burkitt's lymphoma.⁴⁰ Nevertheless, *MYC* rearrangements have been detected in ~8–14% of nodal diffuse large B-cell lymphoma and found associated with a poorer survival.^{29,30} Moreover, nodal 'double hit' diffuse large B-cell lymphoma combining *MYC* and *BCL2* rearrangements have been individualized by their worse prognosis.^{41,42} In PCLBCL-LT, *MYC* rearrangement was a rare feature (13%), while *MYC* expression was frequently detected whatever the *MYC* cytogenetic status (55%). In fact, *MYC* expression in diffuse large B-cell lymphoma lacking *MYC* breakpoint contribute to lymphoma aggressiveness.^{35,43,44} Co-expression of *MYC* and *BCL2* in diffuse large B-cell lymphoma was also shown to correlate with worse prognosis.⁴³ Here, primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type frequently harbored this aggressive phenotype with strong expression of *BCL2* in all cases and *MYC* expression in 10/18 cases.

Inactivation of the *CDKN2A* region, by either deletion at chromosome 9p21.3 or promoter methylation has also been related to a poorer prognosis in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type,^{8,45} as also reported in activated B-cell diffuse

large B-cell lymphoma.³¹ Only 5/23 (21.7%) cases of our series harbored *CDKN2A* deletion. Such low rate may rely on the use of FISH with commercial probe for *CDKN2A* status investigation, which may escape small deletions detected by other methods.^{8,46}

Nodal-activated B-cell DLBCL hallmark is the constitutive activation of the NF- κ B signaling pathway that promotes cell survival, proliferation and inhibition of apoptosis.⁴⁷ Mutations of B-cell receptor molecules (CD79A and CD79B) or of negative (TNFAIP3/A20) and positive (CARD11, TRAF2, TRAF5, MAP3K7/TAK1, and TNFRSF11A/RANK) regulators of NF- κ B¹⁸ all contribute to NF- κ B constitutive activation. They remain to be investigated in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type by next-generation sequencing techniques. Moreover, activating mutation in the Toll/IL-1 receptor domain of MYD88 were shown to drive prosurvival NF- κ B-signaling effects transactivating IRF4 and CARD11 in an oncogenic loop.^{16,19,48}

Contrary to other primary cutaneous B-cell lymphomas subtypes that do not bear the primary cytogenetic alteration of their nodal counterpart, primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type seems to harbor a common genetic profile with nodal-activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma with common primary genetic mutations of *MYD88* and *BLIMP1* alterations.^{16,37} In fact, we also included in our study four cases (cases 18–21) with a loco-regional extracutaneous involvement that were considered as primary skin disease because of a presentation on the limbs (three cases) and histological features of leg-type B-cell lymphoma. Such borderline cases also underline a continuous spectrum between cutaneous and systemic-activated B-cell lymphoma. Our data also support the presence of several genetic alterations in a single tumor, as reported in nodal-activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma.^{16,18} Lenalidomide, a drug showing clinical activity in myeloma and activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma,⁴⁹ together with inhibitors of the B-cell receptor signaling pathway has been recently shown to induce synthetic lethality of activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma cells by downregulating IRF4 and SPIB transcription factors that in turn downregulate NF- κ B pathway.¹⁹ Such molecules could represent an attractive therapeutic option in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type, as NF- κ B pathway seems to be activated⁵⁰ and as most of our patients poorly responded to conventional therapy. Deciphering the multiple genetic alterations of each tumor may contribute to select patients for the appropriate inhibiting therapy.

Acknowledgements

We acknowledge the following French physicians and pathologists for providing data or samples: Sophie Dalac, CHU Dijon; Pascal Joly, CHU Rouen;

Olivier Fitoussi, Clinique Bordeaux Nord, Bordeaux; Houchinghe Eghbali, Institut Bergonié, Bordeaux; Patrick Guillot, Clinique Arès; Christine Merlio, Talence. Most samples were collected through the Tumor Bank of University Hospital of Bordeaux sponsored by a National Cancer Institute SIRIC-BRIO and Cancéropôle Grand Sud-Ouest Program. Clinical data were obtained from the Aquitaine Cutaneous Lymphoma database and the French National Study Group of Lymphoma database. This work is part of the REV-LEG Programme Hospitalier de la Recherche Clinique grant to CHU Bordeaux number 2011/28 also funded by Celgene.

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Vermeer MH, Geelen FA, van Haselen CW, *et al*. Primary cutaneous large B-cell lymphomas of the legs. A distinct type of cutaneous B-cell lymphoma with an intermediate prognosis. Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group. *Arch Dermatol* 1996;132:1304–1308.
- 2 Willemze R, Jaffe ES, Burg G, *et al*. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105:3768–3785.
- 3 Grange F, Beylot-Barry M, Courville P, *et al*. Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type: clinicopathologic features and prognostic analysis in 60 cases. *Arch Dermatol* 2007;143:1144–1150.
- 4 Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, *et al*. (eds) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC: Lyon; 2008; p 242.
- 5 Hoefnagel JJ, Mulder MMS, Dreef E, *et al*. Expression of B-cell transcription factors in primary cutaneous B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2006;19:1270–1276.
- 6 Senff NJ, Hoefnagel JJ, Jansen PM, *et al*. Reclassification of 300 primary cutaneous B-Cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. *J Clin Oncol* 2007;25:1581–1587.
- 7 Zinzani PL, Quaglino P, Pimpinelli N, *et al*. Prognostic factors in primary cutaneous B-cell lymphoma: the Italian Study Group for Cutaneous Lymphomas. *J Clin Oncol* 2006;24:1376–1382.
- 8 Senff NJ, Zoutman WH, Vermeer MH, *et al*. Fine-mapping chromosomal loss at 9p21: correlation with prognosis in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol* 2009;129: 1149–1155.
- 9 Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, *et al*. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503–511.
- 10 Rosenwald A, Wright G, Chan WC, *et al*. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937–1947.
- 11 Hoefnagel JJ, Dijkman R, Basso K.J, *et al*. Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Blood* 2005;105: 3671–3678.

- 12 Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, *et al*. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275–282.
- 13 Meyer PN, Fu K, Greiner TC, *et al*. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol* 2011;29:200–207.
- 14 Pham-Ledard A, Prochazkova-Carlotti M, Vergier B, *et al*. IRF4 expression without IRF4 rearrangement is a general feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol* 2010;130:1470–1472.
- 15 Davis RE, Ngo VN, Lenz G, *et al*. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010;463:88–92.
- 16 Ngo VN, Young RM, Schmitz R, *et al*. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011;470:115–119.
- 17 Shaffer AL, Emre NCT, Romesser PB, *et al*. IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clin Cancer Res* 2009;15:2954–2961.
- 18 Compagno M, Lim WK, Grunn A, *et al*. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009;459:717–721.
- 19 Yang Y, Shaffer AL, Emre NCT, *et al*. Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 2012;21:723–737.
- 20 Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med* 2010;362:1417–1429.
- 21 Mandelbaum J, Bhagat G, Tang H, *et al*. BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 2010;18:568–579.
- 22 Pham-Ledard A, Cappellen D, Martinez F, *et al*. MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol* 2012;132:2118–2120.
- 23 Grange F, Maubec E, Bagot M, *et al*. Treatment of cutaneous B-cell lymphoma, leg type, with age-adapted combinations of chemotherapies and rituximab. *Arch Dermatol* 2009;145:329–330.
- 24 Coiffier B, Lepage E, Briere J, *et al*. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:235–242.
- 25 Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, *et al*. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica* 2013;98:255–263.
- 26 Barrans SL, O'Connor SJM, Evans PAS, *et al*. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2002;117:322–332.
- 27 Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, *et al*. Immunofluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: a GELA study. *J Clin Oncol* 2009;27:5573–5579.
- 28 Shustik J, Han G, Farinha P, *et al*. Correlations between BCL6 rearrangement and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP or R-CHOP. *Haematologica* 2010;95:96–101.
- 29 Barrans S, Crouch S, Smith A, *et al*. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol* 2010;28:3360–3365.
- 30 Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, *et al*. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009;114:3533–3537.
- 31 Jardin F, Jais J-P, Molina T-J, *et al*. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study. *Blood* 2010;116:1092–1104.
- 32 Belaud-Rotureau M-A, Marietta V, Vergier B, *et al*. Inactivation of p16INK4a/CDKN2A gene may be a diagnostic feature of large B cell lymphoma leg type among cutaneous B cell lymphomas. *Virchows Arch* 2008;452:607–620.
- 33 Hallermann C, Kaune KM, Siebert R, *et al*. Chromosomal aberration patterns differ in subtypes of primary cutaneous B cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 2004;122:1495–1502.
- 34 Hoefnagel JJ, Vermeer MH, Jansen PM, *et al*. Bcl-6 and CD10 expression in cutaneous B-cell lymphoma: further support for a follicle centre cell origin and differential diagnostic significance. *Br J Dermatol* 2003;149:1183–1191.
- 35 Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, *et al*. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PLoS ONE* 2012;7:e33813.
- 36 Falini B, Mason DY. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* 2002;99:409–426.
- 37 Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J, *et al*. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 2006;203:311–317.
- 38 Tam W, Gomez M, Chadburn A, *et al*. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2006;107:4090–4100.
- 39 Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, *et al*. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002;17:51–62.
- 40 Dave SS, Fu K, Wright GW, *et al*. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 2006;354:2431–2442.
- 41 Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, *et al*. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood* 2009;114:2273–2279.
- 42 Snuderl M, Kolman OK, Chen Y-B, *et al*. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2010;34:327–340.
- 43 Green TM, Young KH, Visco C, *et al*. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012;30:3460–3467.
- 44 Horn H, Ziepert M, Becher C, *et al*. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts

- outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013;121:2253–2263.
- 45 Dijkman R, Tensen CP, Jordanova ES, *et al*. Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals recurrent chromosomal alterations and prognostic parameters in primary cutaneous large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006;24:296–305.
- 46 Wiesner T, Obenauf AC, Geigl JB, *et al*. 9p21 deletion in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type, may escape detection by standard FISH assays. *J Invest Dermatol* 2009;129:238–240.
- 47 Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, *et al*. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 2001;194:1861–1874.
- 48 Rui L, Schmitz R, Ceribelli M, *et al*. Malignant pirates of the immune system. *Nat Immunol* 2011;12:933–940.
- 49 Hernandez-Ilizaliturri FJ, Deeb G, *et al*. Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype. *Cancer* 2011;117:5058–5066.
- 50 Bhagavathi S, Blenc AM, Amin M, *et al*. Primary cutaneous large B-cell lymphoma shows activation of nuclear factor kappa B and low incidence of Epstein-Barr virus. *Am J Dermatopathol* 2010;32:439–441.

C. Troisième partie: étude des caractéristiques du gène IGHV dans les LBDGC de type jambe.

1. Contexte scientifique

Déterminer la cellule d'origine des hémopathies a toujours été un objectif important des recherches menées sur les différentes entités. Comme cela a été présenté dans l'introduction bibliographique, une cellule d'origine présumée a été proposée pour chaque type de lymphome. Cet objectif nécessite pour les lymphomes B l'étude approfondie de la structure et séquence du gène des immunoglobulines, en plus de l'interprétation du profil d'expression protéique des cellules. En effet, comme nous l'avons rappelé en introduction, l'ontogenèse du lymphocyte B est accompagnée par plusieurs modifications génétiques au niveau des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères de l'immunoglobuline, et l'étude de ces gènes permet donc de présumer des étapes de différenciation accomplies par la cellule, et des forces ou pression de sélection qui ont abouti à la sélection de la cellule. Ces recherches aboutissent le plus souvent à confirmer la cellules d'origine qui pouvait être présumée par l'étude morphologique et phénotypique des cellules (pour revue voir Dunn-Walters et al. 2001; Walsh and Rosenquist 2005). Ainsi, le profil germlinal du gène des immunoglobulines (sans mutations) va traduire une hémopathie dont la cellule d'origine est un lymphocyte B naïf, exprimant IgM et IgD (lymphome du manteau). Les tumeurs issues de cellules B du centre germinatif ou post centre-germinatif vont porter au contraire des mutations de la partie variable des gènes des Ig. Parfois cependant, cela a pu aboutir à séparer au sein d'une même "maladie" deux sous-types différents en termes d'ontogénie. C'est le cas par exemple de la leucémie lymphoïde chronique où un sous-type issu d'une cellule plus immature (sans hypermutation somatique du gène des Ig), est de plus mauvais pronostic qu'un autre sous-type porteur d'un fort taux de mutation, issu d'une cellule B mature, de bon pronostic. De plus, il a été montré que dans le lymphome de Burkitt, les formes endémique et sporadique pouvaient être considérées comme traduisant des mécanismes différents d'oncogenèse, reflétées par un taux de mutations distinct, plus important dans la forme endémique.

L'analyse du profil des mutations des gènes des immunoglobulines dans les LBDGC ganglionnaires a révélé un fort taux de mutations, mais des profils hétérogènes reflétant l'hétérogénéité clinique, morphologique et phénotypique de ce groupe. A l'ère du transcriptomique, les sous-type GC-like et ABC-like se sont révélés différents en terme d'hétérogénéité tumorale, qui était identifiée dans le type GC, suggérant que le processus d'hypermutation somatique continuait après que la cellule B soit devenue tumorale, contrairement au groupe ABC où il n'existait pas de diversité intra-clonale.

Dans les lymphomes cutanés B, quelques équipes avaient abordé ce domaine. La plupart des travaux publiés précédaient la classification actuelle des lymphomes cutanés, et pouvaient comprendre des localisations secondaires cutanées de lymphomes systémiques. Deux articles ont retenu notre attention: Gellrich et al, en 2001, ont étudié 4 LCB-CF et 4 LCB-DGC-type jambe (Gellrich et al. 2001). En 2010, Perez et al ont rapporté l'analyse de 51 LCB, dont 24 LCB-CF, 18 LCB-ZM et 7 LCB-DGC-TJ (Perez et al. 2010). L'étude des LCB-DGC-TJ montrait un profil muté des gènes IGHV sans différence évidente entre les entités. Une diversité intraclonale était observée sur 3/4 LCB-DGC-TJ et 3/4 LCB-CF, suggérant un processus continu d'hypermutation somatique.

2. Objectifs et méthodologie

L'analyse des parties variables des gènes des immunoglobulines a été effectuée en collaboration avec le Dr N. Gachard (INSERM Limoges). En parallèle, l'analyse morphologique et phénotypique a été effectuée à l'EA2406, notamment l'expression des immunoglobulines. Pour approfondir ces travaux, nous avons souhaité étudier le phénomène de commutation de classe, en étudiant la région normalement délétée au cours du switch (région C μ -C γ 3). Le développement d'une sonde de FISH par amplification PCR mixant plusieurs longs fragments d'ADNs a nécessité une mise au point au laboratoire. Nous avons voulu valider cette sonde sur des populations triées de lymphocytes B naïf et mémoire ayant accompli la commutation isotypique. Pour cela, un tri magnétique négatif permettant d'enrichir la population en CD19 a été effectué, puis tri en cytométrie des cellules IgM+, IgM- et IgG+. Les résultats de cette validation ne sont pas présentés dans le manuscrit car ils nécessitent des nouvelles manipulations notamment avec marquage CD27.

3. Résultats et conclusion

Les LCB-DGC-TJ sont porteurs de **mutations des gènes IGHV, à des taux extrêmement élevés (médiane 15,5%)**. Ces mutations sont réparties sur toute la région variable, y compris sur la région VH leader, pouvant expliquer l'échec d'amplification en PCR pour plusieurs cas (mutation sur la zone d'hybridation des amorces?). L'analyse des gènes des chaînes légères a permis d'analyser en partie des cas d'échec pour l'étude des chaînes lourdes où une bande monoclonale ne pouvait être séquencée. Finalement 14/17 cas ont pu être analysés. Sur 2 cas, la recherche de diversité intraclonale a montré une **homogénéité tumorale**, suggérant l'absence de processus continu d'hypermutation somatique (comme dans les LCB-DGC-ABC, mais contrairement à Gellrich et al). **Une IgM était exprimée** dans tous les cas analysés, associée rarement à une IgD. L'étude de la région C μ -C γ 3 révélait des profils distincts et complexes, montrant dans certains cas une commutation isotypique sur un allèle, dans d'autres cas les 2 allèles étaient conservés. Tous ces éléments suggèrent une origine post centre germinatif, sans poursuite du processus d'hypermutation somatique, avec une commutation de classe défectueuse et l'expression persistante d'une IgM.

Ce travail a été présenté en communication orale au congrès européen "*New perspectives in cutaneous lymphoma*", à Paris en Octobre 2014.

A high rate of mutations within immunoglobulin gene variable regions without ongoing mutations suggests a post-germinal center cell origin of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type associated with IgM expression and class switch failure.

Anne Pham-Ledard, Martina Prochazkova-Carlotti, Mélanie Deveza, Marie Beylot-Barry, Béatrice Vergier, Marie Parrens, Jean Feuillard, Jean-Philippe Merlio, Nathalie Gachard

1. EA2406 Histology and Molecular Pathology of Tumors, Univ. Bordeaux, Bordeaux, France
2. Dermatology Department, CHU Bordeaux, Bordeaux, France
3. UMR CNRS 7276, Univ. Limoges, France
6. Pathology Department, CHU Bordeaux, Bordeaux, France
7. Tumor Bank and Tumor Biology Laboratory, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

Running title: IGV gene features in PCDLBCL-LT

Corresponding author: Pr Jean-Philippe Merlio

EA 2406 . Univ. Bordeaux

Bat. 3B, 2ème étage, Zone Nord

146 rue Léo Saignat

33076 Bordeaux, France

Tel [+33 \(0\)5 57 57 10 27](tel:+33(0)557571027)

Fax [+33 \(0\)5 57 57 10 32](tel:+33(0)557571032)

jp.merlio@u-bordeaux2.fr

Manuscrit

Introduction

Primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg-type (PCLBCL-LT) is an aggressive cutaneous lymphoma involving preferentially the leg(s) with rapidly growing tumour(s) in elderly (Swerdlow 2008). Histologically, it is made of confluent sheets of medium to large cells with round nuclei, with an expression profile near from the activated B-cell type of nodal DLBCL (BCL2+, MUM1+, BCL6+/-, CD10-). Gene expression profile analysis, cytogenetic and genetic mutations studies showing frequent *MYD88* mutation, as well as protein expression profile with high IRF4/MUM1 and BCL2 expression bring PCLBCL-LT close to nodal activated B-cell like (ABC) diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), and can suggest a post germinal-center (GC) cell of origin (Hoefnagel et al. 2005; Koens et al. 2013; Pham-Ledard et al. 2013). Moreover, it has been demonstrated that somatic hypermutation of the *BCL6* gene and other proto-oncogenes targeted by aberrant somatic hypermutation (SHM) as *PAX5*, *RhoH*, *MYC* is often present in PCLBCL-LT (8/13), as well as activation-induced cytidine deaminase (AID) protein expression, providing another evidence of a germinal center experienced B-cells derivation of PCLBCL-LT (Dijkman et al. 2006).

As most B-cell lymphomas, PCLBCL-LT usually harbor a clonal rearrangement of the immunoglobulin (Ig) genes. Early B-cell development in bone marrow is characterized by the ordered rearrangement of the Ig heavy chain (IGH) and light chain (IGL) gene loci (LeBien and Tedder 2008). It occurs in an ordered fashion, leading to form a complete and functional V-(D)-J rearrangement (Küppers and Dalla-Favera 2001). This combinatorial V(D)J recombination produces a stochastic repertoire of B cells, each B-cell expressing a unique set of antibody proteins. Antigen-induced B-cell activation and differentiation in secondary lymphoid tissues are mediated by dynamic changes in gene expression that give rise to the germinal center (GC) reaction (LeBien and Tedder 2008). In the T-cell-rich-area, B-cells become fully activated as a result of their interaction with CD4+ T cells and antigen presenting cells, via CD40/CD40ligand interaction together with cytokines stimulation, that promotes GC formation (Klein and Dalla-Favera 2008). The B-cells move to follicle, become highly proliferating B-cells or centroblasts, and in the dark zone of the follicle diversify their Ig variable (IGV) genes acquiring mutations. This process is an affinity maturation process called SHM, introducing base substitutions in the variable region of the IGV gene at a very high rate, that enable selection of the gene (VH and VL domains) with greater affinity for the driving antigen (Steele 2009). Then, these selected B-cells receive growth and differentiation signals that promote class switch recombination (CSR), in the light zone of the GC (Klein and Dalla-Favera 2008). CSR is a DNA recombination and deletion mechanism that juxtaposes a constant region gene to the rearranged VH/DHJH segment, thereby switching the isotype IgM to IgG, IgA, or IgE (Klein and Dalla-Favera 2008). Both SHM and CSR processes absolutely require the activation-induced cytidine deaminase (AID) enzyme presence, and for CSR AID initiates the reaction by creating double strand DNA breaks in the switch (S) regions (Muramatsu et al. 2000). However, all these processes involved in the GC formation can

promote lymphomagenesis by creating DNA breaks (and translocations), mutations, deletions or insertions (Küppers and Dalla-Favera 2001).

To define the cell of origin and evaluate antigen dependence of lymphomas, a molecular study of Ig gene rearrangements in association with sequence analysis is a suitable tool that can give important information about the ontogeny of B-cells, as the maturation history is physiologically imprinted on the Ig gene sequence. Non random, potentially antigen-driven SHM has been described in lymphoid malignancies, and several models have been used to quantify antigen selection pressure. Moreover, *IGHV* usage in *IGH* rearrangements can reveal some bias in a non random usage, and certain *IGHV* genes have been related to some antigens driven SHM, also supported by the identification of groups harboring stereotyped amino-acid changes (Walsh and Rosenquist 2005). In PCDLBCL-LT, few studies have analyzed Ig variable genes in order to hypothesize the cell of origin of this malignancy. Gene expression profiling has suggested that PCLBCL-LT displays an "ABC-like" profile (Hoefnagel et al. 2005), and mutation studies suggests a common lymphomagenesis with ABC-like DLBCL (Pham-Ledard et al. 2012, 2013; Koens et al. 2013). IRF4 overexpression is also a common finding in PCDLBCL-LT (Hoefnagel et al. 2006; Pham-Ledard et al. 2010b), a transcription factor that directly increase AID expression and controls CSR and plasma cell differentiation (Klein et al. 2006; Sciammas et al. 2006). Little is known about the composition of the BCR in PCDLBCL-LT, even gene expression profile (Hoefnagel et al. 2005), the IRF4 expression (Hoefnagel et al. 2006; Pham-Ledard et al. 2010b), and aberrant SHM of proto-oncogenes associated with high expression of AID (Dijkman et al. 2006) suggest that PCDLBCL-LT is derived from a germinal center experienced B-cell. However, PCDLBCL-LT neoplastic cells usually express a primary isotype (IgM+/- IgD) (Koens et al. 2010; Demirkesen et al. 2011) showing that these cells have not undergone CSR that is in contrast with the above data supporting a post germinal center origin of PCDLBCL-LT. To precisely characterize the differentiation stage and cell of origin of PCDLBCL-LT, we analyzed in the present study the structure and sequence of the Ig V heavy and light chains (*IGHV*, *IGLV*, *IGKV*) gene loci from a series of 17 patients, and the Ig isotype expression by immunohistochemistry and immunofluorescence. To further analyze CSR process, we also analyzed by FISH the minimal region of the *IGHM* gene deleted during normal isotype switching (C μ -C γ 3).

Material and methods

Patient selection and data collection

Cases were retrieved retrospectively from the University Hospital (CHU) of Bordeaux, France, from 1998 to 2012. Fourteen patients had already been included in previous studies (Pham-Ledard et al. 2010b, 2012, 2013). The study was performed after patient information and giving written informed consent, according to the Declaration of Helsinki Protocols. Inclusion criteria were: 1- a clinical and histological diagnosis of PCLBCL-LT according to the

WHO-EORTC classification (Willemze et al. 2005) assessed by an expert panel of physicians and pathologists; 2-available fresh frozen skin tumoral sample for DNA analysis. A total of 17 patients with complete clinical, biological and histopathological information were recorded.

DNA extraction and sequencing of IGHV, IGKV, IGLV gene sequences

Genomic DNA was extracted by a standard phenol-chloroform procedure from frozen skin biopsies. For PCR, FR3-JH primers (Ca1/Ca2) were used to amplify the hypervariable third complementary-determining region (CDR3) of the *IgH* gene (Dubus et al. 1996), and using the Biomed-2 strategy with FR1, FR2 and FR3 and JH primers (van Dongen et al. 2003). After excision of monoclonal VDJ rearranged fragments from 2% low melting agarose gels and purification with Qiaquick spin columns following the manufacturer's recommendations, the PCR products were directly sequenced on both strands with the same primers using Sanger's method. Sequencing was performed with the ABI Prism Dye Terminator Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) and reaction products were analyzed on an automatic 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems) using ABI Prism sequencing Analysis 3.7 software. The clonal DNA IGHV, IGKV, or IGLV sequences were aligned with the closest germline sequence using three immunoglobulin sequence database dedicated sites (ImMunoGeneTics databases, VBASE director, and IgBLAST database). Sequences were translated into amino-acids to identify the functional gene rearrangement. The percentage of homology between the functional IGHV segment used by the tumor and the germline sequence was calculated (excluding primer sequences). The percentage of homology was arbitrarily given as 100 minus the percentage of homology. The number of silent (S) and replacing (R) mutations was calculated by comparing the amino-acid sequence of each V domain with its germline IGHV sequence. The length of CDR3 regions was determined according to IGMT numbering.

Statistical analysis of the distribution of somatic mutations between FRs and CDRs segments

Analysis of antigen selection was performed using the multinomial model described by Lossos et al (Lossos et al. 2000b), with an algorithm that automatically compute and simultaneously analyze several sequences (Parrens et al. 2008). The ratio of substitutions resulting in an amino-acid replacement (R) or not (Silent, S) within the Framework regions (FR) or CDR domains was determined and permitted to calculate p-values. This ratio indicates if the B-cell has been selected for expression of a functional antigen receptor within the germinal center.

Analysis of intraclonal heterogeneity

For two patients, one biopsy sample were examined by repeated cloning and sequencing of at least 17 molecular clones from each biopsies. Only the confirmed mutations were considered as evidence of intraclonal heterogeneity.

Immunochemistry and immunofluorescence

Immunohistochemical staining was performed on 2 μm skin sections using standard procedures with IgM, IgD, IgG, and IgA antibodies (NOVOCASTRA, LEICA microsystems, Nanterre, France).

Immunofluorescence analysis were conducted as follow: after dewaxing and rehydration of formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues sections, a heat pre-treatment in a pressure cooker in a pH6 10mM citric acid solution was performed during 10 minutes at full pressure. Then, the pressure cooker was depressurised using running tap water, and slides were washed in a solution phosphate buffer saline with 0.05% Tween 20 during 5 minutes. A 10% fetal bovine serum solution was added to block non specific binding sites, then the primary polyclonal rabbit anti-human IgG/FITC and IgM/FITC (DAKO, Trappes, France) was incubated overnight in a humidified chamber at 4°C. Finally, slides were mounted with Fluoromount containing DAPI and analysed by fluorescence microscopy.

Fluorescence in situ hybridization

A FISH procedure with the IgH split probe (IGH FISH DNA probe, DAKO, Trappes, France) was first conducted to detect any IGH locus rearrangement.

Then, a FISH probe binding at 14q32.2 (C μ -C γ 3 intergenic region) was prepared by mixing seven PCR products amplified using long PCR enzyme mix, according to manufacturer recommendations (Thermoscientific, Fisher Scientific, Illkirch Cedex, France). A control probe at 14p32.12 was obtained from the bacterial artificial chromosome (BAC: CTD-2135P19). The primers, previously published by Ruminy (Ruminy et al. 2011), are in supplemental data. After DNA purification using the QIAquick PCR purification PCR kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), DNA (1 μg) was labelled with Spectrum Red using the nick-translation kit (VYSIS, ABBOTT molecular, Rungis, France) during 3 hours at 15°C. A control Spectrum-Green labelled probe that was centromeric to the C μ -C γ 3 intergenic region at 14q32 was generated with the BAC CTD-2135P19 by nick translation overnight. Then, the 2 probes were prepared, denatured and hybridized to formalin-fixed pre-treated skin sections as previously described (Pham-Ledard et al. 2010a). In samples harbouring abnormalities, we relocalized abnormal nuclei in order to assess the isotype of surface immunoglobulin expression in abnormal nuclei. We used a fluorescence microscope (Imager Z2, ZEISS) and software (Metasystems, Altlußheim, Germany) permitting to relocalise a tumour area on a same slide by the use of a motorized microscope stage (Marzhauser, Wetzlar, Germany) (Pham-Ledard et al. 2013).

Results

Patients and samples, and clinicopathologic features

Seventeen patients with PCLBCL-LT from CHU de Bordeaux were analyzed. Fourteen displaying informative *IGVH* gene analysis constituted the study group. The main clinical, histological, and biological characteristics and follow-up of these 14 patients are shown in Supplementary data. The sex ratio F/M in the study group was 9/5. Age ranged from 50 to 95 (mean: 79). Skin lesions were localized on leg in 9 (64.2%) cases.

All cases, diagnosed by a dermatopathologist expert (BV), were reviewed with a haematopathologist expert (MP). In 3 cases, morphological features were those of Burkitt-like lymphoma, even if clinical features and immunophenotype were in favour for PCDLBCL-LT. One case was atypical, with lymphoblastic, plasmacytoid and aggressive cytology. In the other cases, the tumour was made of confluent sheets of the neoplastic B-cells corresponding to round and large centroblasts and immunoblasts. Out of these cases, 5 were characterised by an intense stromal reaction with multiple inflammatory and reactive T cells within the tumour infiltrate. Immunophenotypic data are presented in supplementary data.

Immunofluorescence technique showed strong IgM expression of almost all tumour cells in all analyzed cases (13/13). In one case, formalin fixed material was not available. IgG was found expressed in 1 case (1/13) both by immunoperoxidase and immunofluorescence. Only 2 cases showed IgD expression, associated to IgM (Table 1).

PCDLBCL-LT have biased *IGHV* gene usage

In 14 out 17 cases, results were informative clonal and in frame functional gene sequences without stop codons, with 9 *IGVH* functional rearrangements, and 5 with light chain functional rearrangements, kappa (*IGKV*: n=3) or lambda (*IGLV*: n=2). Among 9 cases with functional *IGVH* rearrangement identified in this series, when compared to *VH* distribution of normal B-cells, we observed an overrepresentation of *IGHV3* (7/10, 70% versus 55% in normal B-cells) (Lossos et al. 2000b). *IGHV3-23* and *IGHV4-34* were used in two cases, respectively.

In 3 cases, sequences were not interpretable as no monoclonal band could be detected by PCR and then purified. In one out of these 3 cases, a breakpoint with *IGHV* duplication was detected by FISH, no IGH breakpoint was found in the two other cases. The failure to detect any dominant amplificate is most probably because highly mutated rearranged gene segment in PCDLBCL-LT, even in the *VH* leader region, (see below) may sometimes not be recognized by the primers used in the BIOMED 2 protocol.

Mutational profile of *IGHV*, *IGKV* or *IGLV* is consistent with SHM process with features of selection pressure

All cases but one (93%) were highly mutated (mutation rate > 5%), with a median of 15.5%. All the *VH* region displayed mutations, within the FRs and CDRs, and the *VH* leader region. Unmutated (mutation rate <2%) rate was not found, and we observed an

intermediate (ranging from 2 to 5%) mutation rate in 1 case (2.2%). *IGHV* and *IGLV* genes exhibited features of selection pressure in 11 out of 12 analyzed cases (92%). A significant decrease of R mutations in FR with a p-value <5% was seen in 83% of cases, suggesting features of negative selection pressure, selective force to maintain binding to an antigen can be inferred. Less frequently (25% of cases), we observed a significant increase of R mutations in the CDRs sequences, exceeding that expected to occur by chance, suggesting positive selection pressure by antigen (Table 1). Moreover, CDR3 segments were short, without canonical motif.

PCDLBCL-LT cases do not show any intraclonal heterogeneity

To study intraclonal heterogeneity in our series, two patients (cases 3 and 7, table 2) were selected and studied. One sample per patient has been studied. For each sample, at least 10 subclones with identical or nearly identical HCDR3 sequences from each case were compared to the corresponding germline monoclonal sequence.

FISH analysis: the *IGHM* gene is asymmetrically deleted in some cases from the non productive IGH allele

Among 13 analyzed cases, 12 provided interpretable FISH signals (Table 1). In 6 cases, we observed a 2Green/2Red signals pattern, indicating the presence of the 2 alleles of the C μ -C γ 3 region, suggestive of the absence of class switching (Figure 1C). Four cases showed asymmetrical profiles with either 2Green/1Red, either 3Green/2Red, in most tumour cells (except one case harbouring this profile in 20% of nuclei), indicating that the C μ -C γ 3 that encodes the *IGHM* gene is asymmetrically deleted in these IgM+ tumours (Figure 1D). In one selected case, we would correlate C μ -C γ 3 deletion with IgM expression by tumour cells with microscope tracking of the same area, and we observed that the nuclei exhibiting the C μ -C γ 3 deletion were expressing IgM (Figure 1E). In one case, three FISH patterns were observed (3G/1R + 2 residual Red signals, 2G/3R, 3G/3R), and in another case, we observed a deletion encompassing the C μ -C γ 3 and the control region (2G/2R and 1G/1R), not suggestive of switch deletion.

Discussion

The aim of the present study was to define the cell of origin of PCDLBCL-LT, and to analyze possible mechanisms of oncogenesis in this lymphoma that is clinically stereotyped, with extensive tumors developing on leg (s) in elderly patients. Percentage of homology of Ig V sequences (*IGHV*, *IGKV*, or *IGLV*) with germline sequences showed that mean of somatic mutations was 15.5%, indicating highly mutated *IGV* segments in this lymphoma. To address the issue of ongoing mutation in PCDLBCL-LT, two cases were analyzed in cloning experiments with PCR products of rearranged VH genes. With the restriction that only two cases were analyzed, results showed no intraclonal diversity, suggesting that there is no ongoing mutations in this lymphoma subtype. Previous studies of *IGV* gene sequences in

PCDLBCL-LT showed that the region harbored mutation, but at a lower rate (7 cases, median rate 6.5%) (Perez et al. 2010). The absence of ongoing mutation is contradictory with the data of 3 PCDLBCL-LT cases previously reported (Gellrich et al. 2001). However, this high mutation rate without ongoing mutations is strongly suggestive of a post-germinal center cell of origin, and is the same profile that those observed in ABC-like DLBCL (Lossos et al. 2000a). Furthermore, in primary central nervous system (CNS) DLBCL, high mutation rates (mean 13.2%) have been reported, together with V4-34 gene usage, but ongoing mutations were observed in one case (Montesinos-Rongen et al. 1999; Thompsett et al. 1999). It is now admitted that primary CNS DLBCL belongs to the ABC-like category, have been shown to express IgM +/- IgD (Bashir et al. 1989; Deckert et al. 2014) and as PDLBCL-LT, it harbors a high *MYD88*^{L265P} mutation rate of about 70% (Gonzalez-Aguilar et al. 2012; Pham-Ledard et al. 2012, 2014). These two extranodal DLBCL could therefore arise from a similar cell of origin and lymphomagenesis pathway. In PCDLBCL-LT, and in primary CNS DLBCL, the high mutation frequency may be acquired during a prolonged or repeated interaction of the tumour cell (or its precursor) in the microenvironment of GC. However, as no germinal center and follicle formation is commonly observed in both CNS and skin, it remains to be determined how these highly mutated post-GC cells colonize these extranodal sites.

Despite heavily mutated *IGV* segments, tumour cells were able to synthesize a functional immunoglobulin, as the sequences were functional without stop codons, and as we detected an IgM in all cases. We analyzed the distribution of R and S mutations in CDRs and FRs regions, and we observed features of selection pressure in 92% of cases. In most cases (83%), R/S ratio in the FRs clearly suggests that the tumour cell (or their precursors) were selected for functional (negative selection pressure). In 25% of cases, the analysis of potentially functional mutated genes showed a R/S ratio in the CDRs suggestive of positive selection pressure, driven by antigen. In ABC-like DLBCL such features of selection pressure have also been reported (Küppers et al. 1997; Lossos et al. 2000a).

To clarify the fact that this lymphoma harboring post germinal center B-cell features, still express a primary isotype IgM, we analyzed the minimal region deleted during CSR. With FISH, we focused on the *IGHM* gene (C μ -C γ 3 intergenic region) locus which is usually deleted on both alleles during normal isotype switching (Küppers and Dalla-Favera 2001) and in most GC-like DLBCL lymphomas expressing a secondary isotype as IgG or IgA (Ruminy et al. 2011). At contrary, in ABC-like DLBCL with IgM expression, heterozygous deletions of this locus have been reported in 11/18 cases (Ruminy et al. 2011). In PCDLBCL-LT, we observed that in some cases (4/12), *IGHM* gene is asymmetrically deleted from the non-productive allele, with sometimes complex FISH profiles (Figure 1). In half cases (6/12), no deletion was observed, indicating that CSR has not undergone in both alleles. Such data would suggest that a CSR defect prevents isotype switching on the productive *IGH* locus in cases asymmetrically deleted, on both alleles in cases harboring 2 *IGHM* genes, and that CSR defect is not due to a defect of CSR machinery. This defect could be due to deletions located within the S μ region, as it has been reported specifically on the productive allele in ABC-DLBCL with IgM

expression, despite post-GC postulated cell of origin (Lenz et al. 2007; Ruminy et al. 2011). The resistance of PCDLBCL-LT cells to class switch recombination may block these cells in a late stage of differentiation, without the possibility to undergo plasma cell terminal differentiation. In half cases of ABC-like DLBCL, inactivation of *PRDM1* at 6q21 locus (encoding the master plasma cell regulator BLIMP1) have been reported, providing a rationale for this differentiation blockage. In PCDLBCL-LT, we also reported an heterozygous loss of the *PRDM1/BLIMP1* locus in half cases, arguing that the same mechanism may explain absence of terminal plasma-cell differentiation (Pham-Ledard et al. 2013).

Finally, the high rate of mutations in the Ig variable gene segments (median 15.5%), the absence of ongoing mutation, and the evidence of CSR features in PCDLBCL-LT together with IGM expression, provide further data to postulate that this lymphoma is derived from a post-GC cell-of -origin, selected for its antibody expression, together with a blockage of terminal plasma cell differentiation. Further explorations should address how this specific B-cell type colonize extranodal sites such as skin before or after primary oncogenic hits such as *MYD88* mutation. In such patients, the search for circulating B-cells harbouring *MYD88* mutations as already described for *BCL2* rearrangement in FL (Roulland et al. 2006) will address the issue of either a systemic disease with secondary development in an extranodal niche or whether these extranodal lymphoma truly develop locally from a specific resident B-cell type.

References

- Bashir, R, Freedman, A, Harris, N, *et al.* (1989). Immunophenotypic profile of CNS lymphoma: a review of eighteen cases. *J Neurooncol* 7: 249–54.
- Deckert, M, Montesinos-Rongen, M, Brunn, A, *et al.* (2014). Systems biology of primary CNS lymphoma: from genetic aberrations to modeling in mice. *Acta Neuropathol* 127: 175–88.
- Demirkesen, C, Tüzüner, N, Esen, T, *et al.* (2011). The expression of IgM is helpful in the differentiation of primary cutaneous diffuse large B cell lymphoma and follicle center lymphoma. *Leuk Res* 35: 1269–72.
- Dijkman, R, Tensen, CP, Buettner, M, *et al.* (2006). Primary cutaneous follicle center lymphoma and primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type, are both targeted by aberrant somatic hypermutation but demonstrate differential expression of AID. *Blood* 107: 4926–9.
- Van Dongen, JJM, Langerak, AW, Brüggemann, M, *et al.* (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17: 2257–317.
- Dubus, P, Vergier, B, Beylot-Barry, M, *et al.* (1996). Contribution of histopathologic and molecular analyses to the diagnosis of cutaneous B-cell infiltrates. *Mod Pathol* 9: 1147–55.
- Gellrich, S, Rutz, S, Golembowski, S, *et al.* (2001). Primary cutaneous follicle center cell lymphomas and large B cell lymphomas of the leg descend from germinal center cells. A single cell polymerase chain reaction analysis. *J Invest Dermatol* 117: 1512–20.
- Gonzalez-Aguilar, A, Idbaih, A, Boisselier, B, *et al.* (2012). Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. *Clin Cancer Res* 18: 5203–11.
- Hoefnagel, JJ, Dijkman, R, Basso, K, *et al.* (2005). Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Blood* 105: 3671–8.
- Hoefnagel, JJ, Mulder, MMS, Dreef, E, *et al.* (2006). Expression of B-cell transcription factors in primary cutaneous B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 19: 1270–6.
- Klein, U, Casola, S, Cattoretta, G, *et al.* (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 7: 773–82.
- Klein, U, Dalla-Favera, R (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8: 22–33.
- Koens, L, Vermeer, MH, Willemze, R, *et al.* (2010). IgM expression on paraffin sections distinguishes primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type from primary cutaneous follicle center lymphoma. *Am J Surg Pathol* 34: 1043–8.
- Koens, L, Zoutman, WH, Ngarmmlertsirichai, P, *et al.* (2013). Nuclear Factor-κB Pathway-Activating Gene Aberrancies in Primary Cutaneous Large B-Cell Lymphoma, Leg Type. *J Invest Dermatol*.
- Küppers, R, Dalla-Favera, R (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20: 5580–94.

- Küppers, R, Rajewsky, K, Hansmann, ML (1997). Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. *Eur J Immunol* 27: 1398–405.
- LeBien, TW, Tedder, TF (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112: 1570–80.
- Lenz, G, Nagel, I, Siebert, R, *et al.* (2007). Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 204: 633–43.
- Lossos, IS, Alizadeh, AA, Eisen, MB, *et al.* (2000a). Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10209–13.
- Lossos, IS, Okada, CY, Tibshirani, R, *et al.* (2000b). Molecular analysis of immunoglobulin genes in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 95: 1797–803.
- Montesinos-Rongen, M, Küppers, R, Schlüter, D, *et al.* (1999). Primary central nervous system lymphomas are derived from germinal-center B cells and show a preferential usage of the V4-34 gene segment. *Am J Pathol* 155: 2077–86.
- Muramatsu, M, Kinoshita, K, Fagarasan, S, *et al.* (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102: 553–63.
- Parrens, M, Gachard, N, Petit, B, *et al.* (2008). Splenic marginal zone lymphomas and lymphoplasmacytic lymphomas originate from B-cell compartments with two different antigen-exposure histories. *Leukemia* 22: 1621–4.
- Perez, M, Pacchiarotti, A, Frontani, M, *et al.* (2010). Primary cutaneous B-cell lymphoma is associated with somatically hypermutated immunoglobulin variable genes and frequent use of VH1-69 and VH4-59 segments. *Br J Dermatol* 162: 611–8.
- Pham-Ledard, A, Beylot-Barry, M, Barbe, C, *et al.* (2014). High Frequency and Clinical Prognostic Value of MYD88 L265P Mutation in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg-Type. *JAMA Dermatol*.
- Pham-Ledard, A, Cappellen, D, Martinez, F, *et al.* (2012). MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol* 132: 2118–20.
- Pham-Ledard, A, Prochazkova-Carlotti, M, Andrique, L, *et al.* (2013). Multiple genetic alterations in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type support a common lymphomagenesis with activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol*.
- Pham-Ledard, A, Prochazkova-Carlotti, M, Laharanne, E, *et al.* (2010a). IRF4 gene rearrangements define a subgroup of CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma: a study of 54 cases. *J Invest Dermatol* 130: 816–25.
- Pham-Ledard, A, Prochazkova-Carlotti, M, Vergier, B, *et al.* (2010b). IRF4 expression without IRF4 rearrangement is a general feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol* 130: 1470–2.

- Roulland, S, Navarro, J-M, Grenot, P, *et al.* (2006). Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med* 203: 2425–31.
- Ruminy, P, Etancelin, P, Couronné, L, *et al.* (2011). The isotype of the BCR as a surrogate for the GCB and ABC molecular subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 25: 681–8.
- Sciammas, R, Shaffer, AL, Schatz, JH, *et al.* (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* 25: 225–36.
- Steele, EJ (2009). Mechanism of somatic hypermutation: critical analysis of strand biased mutation signatures at A:T and G:C base pairs. *Mol Immunol* 46: 305–20.
- Swerdlow, SH (2008). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *IARC Lyon*.
- Thompson, AR, Ellison, DW, Stevenson, FK, *et al.* (1999). V(H) gene sequences from primary central nervous system lymphomas indicate derivation from highly mutated germinal center B cells with ongoing mutational activity. *Blood* 94: 1738–46.
- Walsh, SH, Rosenquist, R (2005). Immunoglobulin gene analysis of mature B-cell malignancies: reconsideration of cellular origin and potential antigen involvement in pathogenesis. *Med Oncol* 22: 327–41.
- Willemze, R, Jaffe, ES, Burg, G, *et al.* (2005). WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 105: 3768–85.

N°	V	J	Junction VDJ	% mutation	R/S (CDR)	R/D (FR)	IgM/IgD/ IgG	FISH <i>IGHM</i> profile	<i>MYD88</i>	
Case										
		IGHV	IGHJ							
1	del	3-48*01	6*01	CARVRGSHHMDVW	19.1	0.0157	0.0013	+/-/-	2G/2R	L265P
2	and	4-34*01	4*02	CVIGDDGPRLADW	27	0.3869	0.0006	+/-/-	IN	L265P
3	aut	3-7*01	4*03	CMREMDGRGQGSTITW	15.6	0.0057	0.0078	+/-/-	3G/2R	L265P
4	lep	3-23*01	4*02	CTHRQGPNIYW	13	0.5058	0.0281	+/-/-	2G/2R	WT
5	ler	3-23*01	5*01	CARAYGSNWYDYW	17.3	0.1053	0.0006	+/-/-	2G/1R	L265P
6	mic	3-30*03	4*03	CSRDLSTTWSLDSW	18.6	0.1231	0.0006	+/-/-	2G/1R	L265P
7	dan	3-15*5	4*02	CTGGMTKANAYW	14.7	NA	NA	+/-/-	2G/2R	L265P
8	mer	4-39*01	5*02	CTTHGGGHWFDPW	16	0.6169	0.0141	+/-/+	2G/1R	WT
9	cre	4-34*02	6*02	CAGGFYGGGLAFW	15.3	0.0674	0	+/-/-	NI	L265P
		IGKV	IGKJ							
10	man	1-16*01	4*01	CQQYNSY	2.2	NA	NA	+/+/-	2G/2R	WT
11	lou	3D-20*01	4*01	CQQYNSSPLTF	5.5	0.8546	0.0564	+/-/-	2G/2R	L265P
12	ste	4-1*01	4*01	CQQYYAPPFTF	7.4	0.0511	0.0016	+/+/-	2G/2R and 1G/1R	L265P
		IGHV								
13	cap	3-7*01	4*02	CSRERPEGGDFDCW	NA	0.0618	0.0127	+/-/-	2G/2R	L265P
13	cap	3-13*01	4*02	CAKGRAPPDW	NA	0.0092	0.1081	-	-	-
		IGLV	IGLJ							
13	cap	1-47*01	3*02	CAVWDNNLQAWVF	8.75	NA	NA	-	-	-
14	Bre	2-8*01	3*02	CSSYGDNDKWLF	18.4	NA	NA	NA	NA	L265P

Table 1: *IgHV* gene features, Ig expression, *IGHM* gene status in FISH, and *MYD88* mutation in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. CDR: complementary determining region, FR: framework region; R: replacement mutation; S: silent mutation, WT: wild type

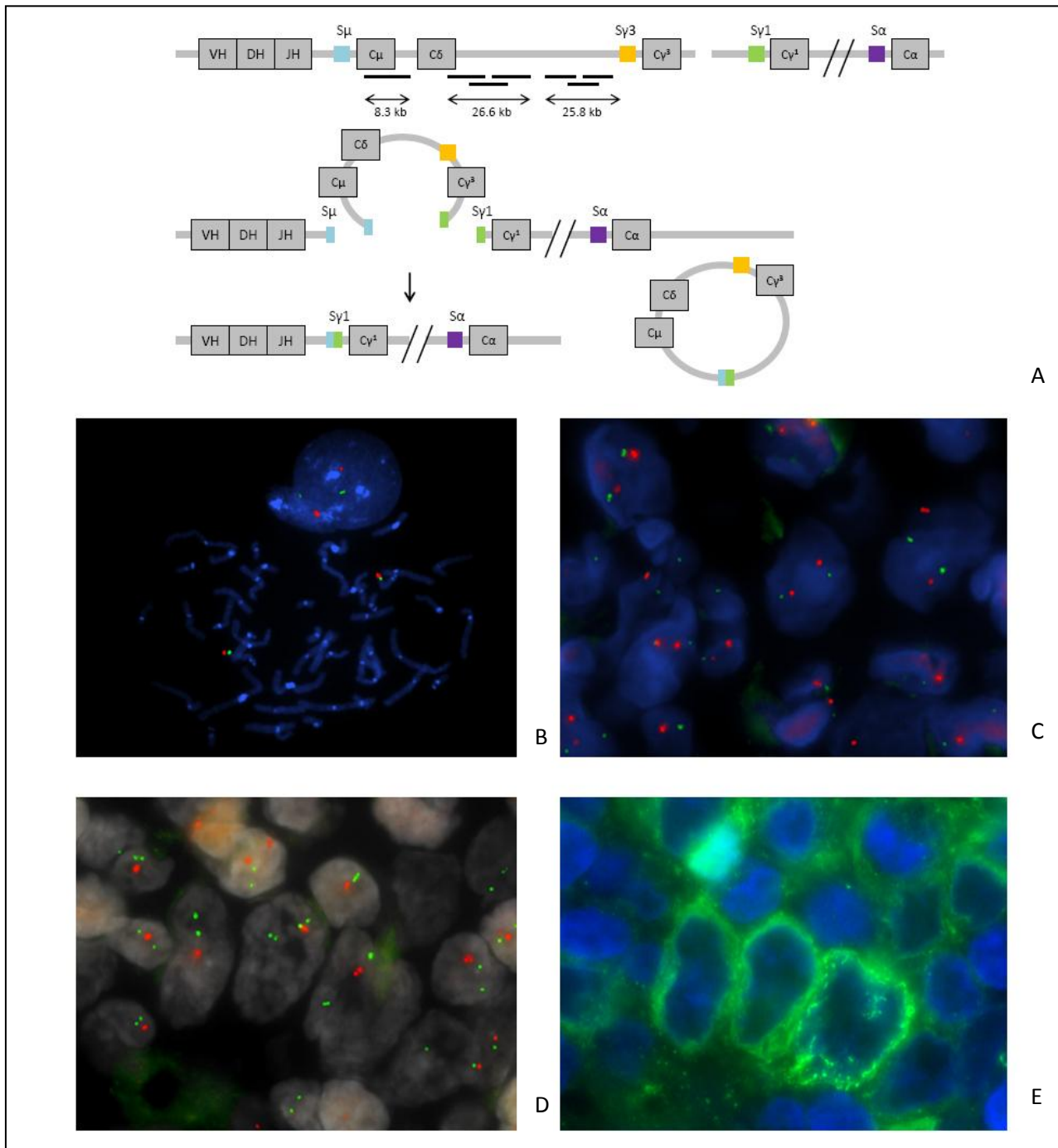


Figure 1: FISH and IgM expression experiments in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type. A: Representation of the C μ -C γ 3 region (14q32.2) and a part of the *IGH* gene. Rearranged VHDHJH (variable part of *IGH*), and downstream constant genes (C μ , C δ , C γ 3, C γ 1, C α ...) preceded by each Switch sequence (S). Class switch recombination (CSR) conducts to a deletion of at the minimum the intergenic C μ -C γ 3 region, that is targeted by the FISH experiment (mixing 7 PCR products, primers are represented with black lines, labeled with spectrum Red). B: FISH probe on healthy donor T-lymphocytes metaphase (germline *IGH* gene, showing to fusion signals in metaphase and 2Green/2Red (2G/2R) pattern on interphase nuclei). Green signals are provided by control probe at 14q32.12 (CTD-2135P19). C: FISH on case 10, showing 2G/2R pattern indicating the absence of CSR. D and E: FISH and IgM immunostaining on case 5, showing a asymmetrically profile (2G/1R pattern) indicating C μ -C γ 3 deletion on the non-functional allele (D), together with IgM expression by the same cells (E).

Supplementary data:

PCR primers pairs to generate the $C\mu-C\gamma3$ FISF probe for FISH experiments (from Ruminy et al, Leukemia, 2011):

MG1F : CCTCACCAAGTCCACCAAGT

MG1R : GGTACGCAAGGTCATCTGGT

MG2F : TGACCCACCCAGACTACACA

MG2R : AGCAAGTCTACCAGGCTCCA

MG3F : TGGAGCCTGGTAGACTTGCT

MG3R : CATCCTGCAGTGAGGAGACA

MG4F : AGGCCATTGCAACCTTACAC

MG4R : CCACAGGAGCTGGAAGAGTC

MG5F : GAACTTCTGCTGGGCTATGC

MG5R : CAGAGGAGCAACCTCCTGAC

MG6F : TGA CTGTTTCCTTGCTGTGC

MG6R : TGGGAGGTATTGGGGTCATA

MG7F : TAGGCTGCTCACCTTGGTCT

MG7R : GAAGCAGCACCATCTTCACA.

N° Case	Gender/age	Location	TNM	Therapy	CR	Skin Relapse (months)	Extracutaneous progression (months, site)	Final Status (months of follow-up)	Phenotype BCL2-MUM1-BCL6-CD10
1 del	M/59	Leg	T2N0M0	RT	No	-	Yes (8, cerebral)	DD (13)	+/-/-/-
2 and	M/72	Arm	T2N0M0	RT	Yes	Yes (10)	Yes (24, digestive)	DD(26)	+/+/+/-
3 aut	F/88	Leg	T2aN0M0	R-PC + RT	Yes	Yes (32)	No	DD (46)	+/+/+/-
4 lep	M/75	Arm	T1bN1M0	R-PC	Yes	Yes (14)	Yes(0, node)	DD(18)	+/+/+/-
5 ler	F/81	Trunk	T3aN0M1	R-PC	Yes	Yes (9)	Yes (0, bone)	DD (16)	+/+/+/+
6 mic	F/75	Leg	T1xN1M0	R-PC	Yes	Yes (8)	Yes (0, node)	DD (68)	+/+/+/-
7 dan	F/95	Leg	T1aN0M0	RT	Yes	No	No	CR (24)	+/+/+/-
8 mer	M/90	Leg	T2bN0M0	R-PC	Yes	Yes (14)	Yes (20, bone)	DD (22)	+/+/+/-
9 cre	F/82	Arm	T1bN0M0	RT	Yes	No	Yes (15, spleen)	DD (16)	+/+/+/-
10 man	M/62	Leg	T2bN0M0	R-PC	Yes	No	No	CR (52)	+/+/+/-
11 lou	F/73	Leg	T3aN0M0	NA	NA	NA	NA	NA	+/+/+/-
12 ste	F/63	Leg	T2bN0M0	R-PC	Yes	No	No	CR (28)	+/+/+/-
13 cap	F/88	Arm	T2N0M0	PC	No	-	No	DD (5)	+/-/-/-
14 Bre	F/83	All/Leg	T3bN0M0	RT	No	-	Yes (2, bone)	DD (5)	+/+/+/-

Supplemental table: Clinical features and immunophenotype of the patients with primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type. AWD: alive with disease, CR: complete remission, , DD: dead of disease, F: Female, M: Male, R-PC: Rituximab associated with polychemotherapy, RT: Radiation therapy, TNM: Tumour Node Metastasis stage.

D. Quatrième partie: étude de la translocation t(14;18) dans les lymphomes cutanés B des centres folliculaires

1. Contexte scientifique

Selon la classification WHO-EORTC 2005, les lymphomes cutanés primitifs B de type centro-folliculaire (LCPCF) sont indolents et de bon pronostic. Cependant, une évolution extra cutanée peut être observée au cours de l'évolution sans qu'existe de marqueur prédictif. La translocation (14;18)(q32;q21) aboutissant à la surexpression de l'oncogène BCL2 est présente dans 70 à 95% des cas de lymphomes folliculaires ganglionnaires, mais sa prévalence dans les LCPCF est mal connue. Il s'agit d'une donnée controversée dans la littérature probablement par une inclusion aléatoire des cas (pouvant inclure des cas de lymphomes cutanés secondaires) et des techniques d'analyse de sensibilité et spécificité différentes (PCR et FISH). Sa valeur diagnostique ou pronostique au sein des LCP-CF n'a jamais été étudiée, pourtant la recherche de cette translocation est souvent demandée "en routine". Un résultat positif est déroutant pour le clinicien, qui en l'état actuel des connaissances n'a pas de rationnel précis pour établir une prise en charge adaptée de ces malades. De plus, le bilan des lymphomes folliculaires cutanés peut dans certains pays comprendre une biopsie médullaire systématique si l'on pense que ces lymphomes ne peuvent être distingués sans cela des lymphomes folliculaires ganglionnaires.

2. Objectifs et méthodologie

Notre objectif était d'évaluer dans une série de LCP-CF la prévalence de la t(14;18) ainsi que son éventuelle valeur diagnostique et/ou pronostique. Pour cela 53 patients de notre centre présentant une lésion cutanée correspondant à un lymphome folliculaire ont été sélectionnés rétrospectivement. Le bilan d'extension initial classait les patients en LCP-CF ou en localisation cutanée secondaire de lymphome folliculaire ganglionnaire (LFG). Les données clinique et évolutives, histologiques morphologiques, architecturales et phénotypiques de la série étaient revues. La recherche de la t(14;18) était effectuée par FISH sur les biopsies cutanées. Les proportions ont été comparées par le test du khi-deux ou de Fisher, les courbes de survie (méthode de Kaplan-Meier) par le test du Log Rank.

3. Résultats et conclusions

Au sein des 53 patients, le bilan d'extension identifiait 47 LCP-CF et 6 LFG; 7 patients avaient une t(14;18) (4 LCPCF et 3 LFG). La présence d'une t(14,18) était associée à un bilan d'extension positif avec atteinte ganglionnaire et/ou médullaire ($p=0,02$). **La prévalence de la t(14,18) était de 8,5% dans les LCP-CF et de 50% dans les LFG avec présentation cutanée.**

Tous les cas où une translocation était identifiée avaient un phénotype BCL2+ CD10+, alors que l'expression de BCL2 et de CD10 est considérée comme variable dans le LCB-CF.

Une étude des facteurs associés à la première récurrence cutanée après mise en rémission complète a été effectuée pour 44 LCPCF. 40,9% des patients avaient au moins une rechute cutanée (délai médian de 33 mois), et 10,6% présentaient une évolution extra-cutanée différée (délai médian de 80 mois). **La présence de cellules de taille petite à moyenne était associée avec une plus grande probabilité de récurrence cutanée (p=0,01)**, contrairement aux autres paramètres étudiés (âge supérieur à 60 ans, sexe, stade T, taille supérieure à 5 cm, siège de la lésion, traitement initial, présence d'un clone B dans la peau, présence d'un clone B identique peau / sang, positivité du BCL2, t(14;18). Deux des patients (4,5%) classés LCP-CF ayant une t(14;18) sur la biopsie initiale ont présenté une évolution extra cutanée secondaire à 29 et 55 mois, et un est décédé de son lymphome.

La présence d'une t(14;18) était significativement associée à un bilan d'extension initial positif, et pourrait être un marqueur d'EEC même si nos effectifs étaient trop faibles pour le montrer du fait de la rareté d'une telle évolution.

Finalement, la recherche de t(14;18) par FISH pourrait être utile au moment du diagnostic d'une lésion cutanée correspondant à un lymphome centrofolliculaire présentant un phénotype BCL2+CD10+. En cas de positivité de la FISH, il semblerait licite de réaliser un bilan d'extension exhaustif avec biopsie ostéo-médullaire, ce qui n'est pas obligatoire dans les recommandations actuelles en France mais l'est toujours au Pays Bas (Senff et al. 2008a). Cependant, la stratégie "watch and wait" habituellement adoptée par les hématologues en cas de lymphome folliculaire asymptomatique et de faible masse tumorale pourrait amener à reconsidérer l'utilité de la biopsie médullaire y compris lorsqu'il existe une t(14 ;18). On pourrait proposer une surveillance clinique rapprochée aux patients ayant une t(14;18) (sur-risque d'évolution extra cutanée probable) ainsi qu'à ceux ayant une morphologie de cellules de taille petite à moyenne (sur-risque de récurrence cutanée). Une autre possibilité serait également de déterminer si ces patients présentent des cellules tumorales circulantes porteuses de la t(14 ;18) ou de l'ADN libre circulant et de tester ces paramètres pour la surveillance de ces patients. Cependant, notre équipe avait déjà démontré la présence d'une amplification par PCR dans la peau et le sang du réarrangement BCL2-IGH sans que cette détection moléculaire soit associée à la détection par FISH de la translocation au niveau des lésions cutanées (Vergier et al. 2004).

4. **Publication: 1 article accepté**

Pham-Ledard A., Cowppli-Bony A., Doussau A., Prochazkova-Carlotti M., Laharanne E., Jouary T., Belaud-Rotureau MA., Vergier B., Merlio JP., et Beylot-Barry M.

Diagnostic and prognostic value of *BCL2* rearrangement in 53 patients with follicular lymphoma presenting as primary skin lesions

Accepté le 18 aout 2014 dans American Journal of Clinical Pathology

Diagnostic and prognostic value of *BCL2* rearrangement in 53 patients with follicular lymphoma presenting as primary skin lesions

Anne Pham-Ledard, MD (1,3), Anne Cowppli-Bony, MD (2), Adélaïde Doussau, MD (2), Martina Prochazkova-Carlotti PhD (3), Elodie Laharanne, PhD (3,4), Thomas Jouary, MD (1), Marc-Antoine Belaud-Rotureau, PhD (3), Béatrice Vergier, MD, PhD (3,4), Jean-Philippe Merlio, MD, PhD (3,4), Marie Beylot-Barry, MD, PhD (1,3).

1. Dermatology Department, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France
2. Clinical Epidemiology Unit, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France
3. EA2406 Histology and Molecular Pathology of Tumours, Univ. Bordeaux, Bordeaux, France
4. Pathology Department, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

Corresponding author: Dr Anne Pham-Ledard, Department of Dermatology, CHU de Bordeaux. Maison du Haut Lévêque, 1 avenue de Magellan, 33604 PESSAC cedex, France

Tel : +33 (0)5 57 65 64 32, Fax : +33 (0)5 57 65 65 02

Mail : anne.pham-ledard@chu-bordeaux.fr

Word count: 4124, 3 Tables, 3 Figures

Acknowledgment and Funding: We are indebted to Virginie Rondeau (INSERM U897, Bordeaux, France) for statistical support, Dr Marie Parrens (Department of Pathology, CHU de Bordeaux, France) for her hematopathological expertise, pathologists and physicians for their precious help. Patients' material was obtained through the Tumor Bank of CHU Bordeaux and Cancéropôle Grand Sud Ouest. This study was supported by the Société Française de Dermatologie, and the Conseil Régional d'Aquitaine, Ligue contre le Cancer, and Institut National contre le Cancer (INCa) for the Aquitaine database of cutaneous lymphoma cohort

Financial Disclosure: None reported

Brief Title: t(14;18) in cutaneous follicular lymphoma

Key words: primary cutaneous follicle center lymphoma, follicular lymphoma, translocation t(14;18), *BCL2* rearrangement, FISH

Abstract

Objectives: To study the diagnostic value of *BCL2* rearrangement in follicular centre lymphoma (FCL) presenting as primary skin lesions, and to evaluate its prevalence and the prognostic value in primary cutaneous FCL (PCFCL). To evaluate prognostic factors in PCFCL.

Methods: 53 patients with cutaneous presentation of FCL without history of nodal lymphoma were selected retrospectively. Clinical and histological data were collected together with staging and follow-up data. FISH test for *BCL2* split probes was performed on skin biopsies.

Results: Initial staging procedures identified 47 PCFCL and 6 secondary skin involvement of FCL (SSIFCL). FISH detected 7 cases as carrying a *BCL2* rearrangement : 4 of 47 PCFCL (8.5%) and 3 of 6 SSIFCL (50%). These 7 cases co-expressed BCL2 and CD10. In PCFCL, cutaneous relapse rate was 39%. A small/medium centrocytic cell population was associated with higher probability of skin relapse ($p=0,008$) in univariate and multivariate analysis, and *BCL2* rearrangement detection was associated with secondary extracutaneous spreading ($p=0.05$).

Conclusions: We observed that *BCL2* rearrangement in PCFCL is rare, associated with initial positivity of staging (diagnostic value), or with secondary extracutaneous spreading (prognostic value). In selected cases with BCL2-CD10 co-expression, FISH testing could detect patients with poor outcome and require closer monitoring.

Introduction

Primary cutaneous lymphomas (PCL) of B-cell origin account for 25% of all PCL. Three main types of primary cutaneous B-cell lymphomas are recognized: primary cutaneous follicle centre lymphoma (PCFCL), primary cutaneous marginal zone lymphoma (PCMZL) and primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type (PCLBCL, leg type)^{1,2}. PCFCL, representing approximately 55% of all primary cutaneous B-cell lymphomas, is the most common B-cell lymphoma to occur as a primary tumour of skin³. PCFCL usually involves head and neck or trunk, with solitary or grouped plaques and tumours, while multifocal skin lesions are possible. Morphologically, PCFCL exhibits a proliferation of neoplastic follicle centre cells, usually a mixture of small/medium size and large centrocytes (sometimes spindle shaped type) and a variable proportion of centroblasts. Architectural pattern is variable among a continuum from follicular, nodular, sometimes focally periadnexal to diffuse growth patterns. PCFCL, even with predominance of large cells (large centrocytes or centroblasts), has an indolent behaviour characterized by a 5-year survival rate of 95% as opposed to the 41% rate of PCLBCL, leg type^{1,4,5}. Multifocal lesions do not have a poorer outcome than solitary lesions³. PCFCL presenting on the leg displays a poorer prognosis, with 5-year disease specific survival reported at 41%⁴. Skin relapse is observed in 30 to 45% of patients. Recurrence does not affect prognosis and is usually confined to the skin. Secondary extracutaneous dissemination may occur in 5 to 10% of cases^{4,5}. Furthermore, secondary skin involvement by nodal follicular lymphoma (SSIFCL) may share clinico-pathological similarities with PCFCL, especially if skin lesions are the initial manifestation of a systemic disease. Therefore, a negative staging is required to assert PCFCL and to rule out SSIFCL as both diseases require a different treatment⁶.

The hallmark of nodal follicular lymphoma is the t(14;18)(q32;q21) translocation which consists of a reciprocal translocation between the *BCL2* proto-oncogene and the immunoglobulin heavy chain (*IgH*) gene leading to the overexpression of BCL2 protein. Therefore, the t(14;18) should be detected either by polymerase chain reaction (PCR) for *BCL2-IgH* breakpoint amplification or by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for either *BCL2-IgH* fusion or *BCL2* separation or split. In nodal follicular lymphoma, interphase FISH has been found to detect a higher rate of positive cases for *BCL2* rearrangement than the BIOMED-2 PCR protocol⁹. While the *BCL2* rearrangement is observed in 80 to 90% of cases of follicular lymphoma, this genetic alteration was not detected in several series of PCFCL including the one from our group using both FISH and PCR with BIOMED-2 techniques^{1,7-9}. However, Streubel et al.¹⁴ found a *BCL2-IgH* fusion by FISH in 41% of PCFCL cases although they were not able to amplify the *BCL2-IgH* breakpoint by the BIOMED2 PCR protocol in FISH positive cases. Alternatively, PCR amplification of the *BCL2-IgH* breakpoint provided positive results in some series of PCFCL cases but we clearly demonstrated that molecular detection alone is able to pick-up B-cells carrying BCL2-JH rearrangement as described in healthy carriers⁹⁻¹⁴ (Table 1). Besides the technical aspects, most of the above studies did not provide extensive staging and follow-up data that may account for such discordance in patients with different inclusion criteria.

This prompted us to analyze by FISH the prevalence of the *BCL2* rearrangement in FCL with skin presentation before staging procedures. The main goal of this study was to estimate the

prevalence of *BCL2* rearrangement in the largest series of PCFCL studied so far and to determine if the detection of a *BCL2* rearrangement could represent a biomarker that would help patient management at diagnosis. Thanks to an extended follow-up, we also investigated prognostic factors that would predict relapse or extracutaneous spreading in PCFCL.

Material and methods

Patient's selection

Cases were retrieved retrospectively from the Aquitaine database of cutaneous lymphoma and from dermatological departments of the University Hospital of Bordeaux from 1994 to 2009 (regional referral centre for cutaneous lymphomas). The study was performed after patient information and consent, according to the guidelines of the french bioethical law and to the declaration of Helsinki principles.

Patients were indeed consecutively included on the following requirements criteria

- 1) Cutaneous lesions of FCL at presentation in patients without history of B-cell lymphoma. A systematic review of clinical, staging and histopathological features has been made by an expert panel of dermatologists and pathologists, using the criteria of the WHO classification.
- 2) Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) tissue blocks or frozen material available for molecular studies.

Histological and clinical data collected

For all cases, haematoxylin-eosin-safran-stained sections and routine immunostaining were reviewed retrospectively. *BCL2*, *BCL6* and *CD10* immunostainings were considered as positive if 50% or more of tumour cells expressed the protein. Comparison with *CD3* staining on consecutive sections allowed to discard the strong expression of *BCL2* by reactive T-cells in such PCFCL cases considered as *BCL2* positive as the staining was moderate and restricted to B-cells. In cases predominantly composed of small/medium centrocytic cells, architectural, cytological and immunohistochemical features excluded PCMZL. For three cases, small biopsies limited the interpretation of architectural features but no specific feature of PCMZL was observed (typical colonization of follicular dendritic cell meshwork, immunophenotype, immunoglobulin light chain restricted plasma cell) both on primary lesion or relapse (n=2). In cases predominantly composed on monotonous population of large centrocytes or centroblasts, a "non-activated B-cell" (germinal center) phenotype permitted us to rule out PCLBCL-leg-type.

Staging procedures were performed according to international recommendations^{6,8} including detailed history and complete physical examination, routine laboratory tests, computed tomography of thorax and abdomen and bone marrow biopsy for most patients (n=37, 70%, including all patients with (14;18)-positive detection). This allowed separating the patients in two groups: PCFCL (n=47) and SSIFCL with concomitant skin involvement (n=6). Patients with PCFCL were classified according to the adapted TNM classification¹⁵. Gender, age at diagnosis, site and size of skin lesion,

initial therapy, cutaneous relapses, secondary extra-cutaneous spreading, status at last follow-up and duration of follow-up were recorded. Follow-up was updated at March, 2013.

PCR amplification for B-cell clonality analysis

DNA was extracted from frozen or FFPE skin biopsies (n=45) and from peripheral blood lymphocytes (n=44). FR3-JH primers (Ca1/Ca2) were used to amplify the hypervariable third complementarity-determining region (CDR3) of the *IgH* gene¹⁶.

FISH analysis of the *BCL2* locus

The translocation t(14;18)(q32;q21) at both the major breakpoint region or the minor cluster region was detected by interphase FISH with separation probes (*BCL2* FISH DNA probe, Split Signal; DAKO, Trappes, France). Four μm tissue-sections were obtained from FFPE skin tumoral biopsies (n=50) and FISH analysis was conducted with the histology FISH accessory kit (DAKO). In 3 cases frozen skin touch imprints were hybridized as described before¹⁷. FISH patterns were determined by analyzing 200 non-overlapped nuclei as reported⁹. Cases with a *BCL2* breakpoint were then referred as t(14;18)-positive FCL, because translocation partners other than *IgH* are exceedingly rarely affected in FCL².

PCR amplification of *BCL2*-JH rearrangement

The *IGH*-*BCL2* fusion was sought by PCR amplification targeting the JH joining region of the *IgH* gene and distinct regions of the *BCL2* gene. DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes and frozen skin biopsies of positive FISH cases. According to the BIOMED-2 protocol¹⁸, 3 master mixes were used to identify *BCL2* breakpoints MBR (mix A), 3'MBR (mix B), mcr and 5' MCR (mix C).

Response criteria and statistical analysis

Patients with PCFCL were included for statistical analysis of prognosis factors, while patients with a positive extra-cutaneous staging were excluded. The primary end point was disease free survival (DFS). In Kaplan-Meier analysis and Cox proportional hazard model of DFS, time was defined as the time relapsed from diagnosis date to the date of first disease recurrence or death. Time was censored for patients who had not experienced disease recurrence or had not died at the time of last follow-up. Potential prognosis factors examined in our study were patient age (dichotomized in 2 classes: > 60 years vs < 60 years) and gender at diagnosis, extent of cutaneous involvement according to TNM classification (T2/T3 vs T1), tumor size (> 5 cm vs < 5 cm), type of predominant cell population (large centrocytes and or centroblasts vs small to medium centrocytes), site of cutaneous lesions, initial therapy, presence of a *IgH* monoclonal rearrangement, presence of an identical *IgH* rearrangement in skin and blood, *BCL2* expression in immunochemistry, *BCL2* and CD10 co-expression, presence of a *BCL2* rearrangement. For univariate analysis, survival functions were compared with non-parametric log rank test for each

prognosis factor. Factors with p values < 0.2 in the univariate analysis were entered in a multivariate Cox model to estimate hazards ratio (HR) and sequentially removed from the model if they were not significantly associated with DFS at the 0.05 level.

In order to analyse recurrence, estimation of survival functions, univariate and multivariate analysis were secondarily performed using a shared gamma-frailty model. In this model, a random effect is added for each subject in order to adjust to correlation of recurrence within subjects²². In this analysis, time variable ("gap time") was the time since the latest event (diagnosis or recurrence). Time was censored for patients who had no disease recurrence or had not died at the time of last follow-up. Analysis were performed with SAS (version 9.3) and R (version 2.12.3) using the survival and frailty pack packages from frailty model¹⁹.

Results

According to inclusion criteria (FCL first presenting in the skin), 60 patients were recorded. Fifty-three gave informative molecular results and constituted the study group, classified as PCFCL (n=47) or SSIFCL (n=6) after staging procedures. Their clinical and follow-up data are summarized in Table 2. Nineteen out of these 53 patients have already been included in a 30 cases study of our group⁹.

Clinicopathological data at diagnosis

The Figure 1 illustrates clinical and histological features of the PCFCL group. Table 2 summarizes the clinicopathological data of all patients, 47 with a final diagnosis of PCFCL and 6 with SSIFCL.

Among the 47 PCFCL cases, there were 20 women and 27 men, with an age at diagnosis ranged between 27 and 93 years (mean: 57 years, median: 56 years). Skin lesion consisted of cutaneous papules, nodules, tumours, or deeply infiltrated plaques. Most patients (n=21; 44.7%) had a solitary lesion and were classified as T1, followed by T2 (multiple skin lesions in a regional skin involvement) (n=20; 42.5%). Only six patients had cutaneous lesions corresponding to the multifocal or generalized T3 stage (12.8%). The most frequently involved body region was "head and neck" (n=24; 51.1%), followed by "chest or upper back" (n= 17; 36.2%) and "arm(s)" (n =2; 4.2%). None of the patients had leg involvement in this study (neither PCFCL nor SSIFCL). In the PCFCL group, radiotherapy was the most common treatment, 17 patients had radiation (36.2%) and 7 patients had surgery followed by radiation (14.9%). Eight (17%) patients were treated by surgery, 8 (17%) by polychemotherapy (with or without rituximab), 6 patients (12.8%) had rituximab alone and one patient received interferon. All the patients with SSIFCL had multiple skin lesions, with deeply infiltrated plaques or nodules. Among them, only one patient had a bone marrow infiltration as the only manifestation of extra cutaneous disease. Five out of 6 had node involvement, with bone marrow infiltration in 2 cases, and a negative bone marrow biopsy in 3 cases.

Among the 47 cases of PCFCL, histopathological analysis showed that 33 (70.2%) cases had a predominance of small/medium centrocytes (Figure 1E, 1G, 1I), and 14 (29.8%) a predominance

of large centrocytes and/or centroblasts, with either a predominance of large centrocytes (including spindle-shaped cells) (n=4) or large centrocytes mixed with variable proportion of centroblasts (n=10) (Fig. 1F, 1H, 1J, 1K). All cases had a follicular (with or without periadnexal distribution) or follicular and/or diffuse growth patterns. Among cases with predominance of small/medium centrocytes, four cases displayed a very dense follicular growth pattern with ill-defined follicles without periadnexal distribution (Type A pattern, as shown on Figure 2B, resembling "a node in the skin"). Other cases were characterised by a less abundant infiltrate with follicular growth pattern and periadnexal distribution (Type B pattern, Figure 1E). Among 14 cases with large cell predominance, four harboured a diffuse growth pattern, and 10 exhibited a nodular to diffuse growth pattern. Expression of BCL2 by more than 50% of neoplastic cells was observed in 25 (53%) cases. Co-expression of BCL2 and CD10 was found in 13 PCFCL cases (13 out of 37; 35%). A monoclonal *IgH* gene rearrangement was detected by PCR on skin biopsies in 30 out of 45 PCFCL cases tested (66%) using FR3-JH primers¹⁶. Four (9%) of the 44 cases PCFCL tested had an identical *IgH* rearrangement in skin and blood. Among the 6 SSIFCL, one exhibited a large cell morphology, and 5 had a predominance of small/medium centrocytes. Architectural patterns were a type A in 3 cases, and a type B in 3 cases. All SSIFCL co-expressed BCL2 and CD10, and 2 out of 6 had an identical *IgH* rearrangement in skin and blood.

FISH analysis

A *BCL2* breakpoint was identified in more than 10% of cells (20% to 80% of nucleus analyzed) by FISH in seven out of the 53 cases (13.2%). They corresponded to 4 PCFCL (4 out of 47, 8.5%) and 3 SSIFCL (3 out of 6, 50%). Clinical features of patients with a positive FISH test are summarized on Table 3. The presence of a *BCL2* breakpoint was significantly associated with extra-cutaneous involvement at the time of diagnosis (Fisher exact test, $p = 0.02$) with a specificity at 91% and a negative predictive value at 93%. Interestingly, the single patient diagnosed with SSIFCL on the sole basis of bone marrow infiltration, with otherwise negative staging, displayed *BCL2* rearranged lesion.

PCR amplification of *BCL2-JH* rearrangement

Out of 4 FISH positive PCFCL cases, BIOMED-2 PCR amplification was positive in all cases on skin biopsies with mix A (3 cases) or mix C (1 case) primers thus showing a *MBR-JH* breakpoint. We did not detect any corresponding *BCL2-JH* rearrangement in the blood of these 4 PCFCL patients tested using such protocol with a detection threshold at 3%. Two out of three SSIFCL patients with FISH positivity had positive PCR amplification with mix A in skin material, and one of them had a similar band in concomitant peripheral blood sample.

Relapse rate and extra-cutaneous spreading in 47 PCFCL patients (Table 2 and 4)

Among 47 PCFCL, forty-six patients (97.9%) achieved complete remission after initial therapy. Among them, disease relapse occurred in 20 patients (42.6%) after a median of 35 months (range 1-170). Eight patients experienced two or more cutaneous relapses with a median of 4

relapses. The time between two events tended to decrease with the number of relapses.

Extracutaneous evolution (nodal involvement) was observed during follow-up in five patients with PCFCL (5 out of 47, 10.6%) after a median of 80 months (Table 3, cases 2-3-5-6-7). Their initial staging was exhaustive including negative bone marrow examination. Among these 5 patients, 3 harboured a BCL2-CD10-positive phenotype and 2 exhibited a *BCL2* rearrangement. Extracutaneous spreading was associated with synchronous cutaneous relapses in these patients.

At final point, two patients died (one patient, exhibiting a *BCL2* rearrangement, died of disease after extra-cutaneous spreading, one other patient died of another cause). Four were alive with disease, and 43 (91.5%) were alive in complete remission. The median follow-up was 39 months (range 1-191). The 12-months, 36-months and 60-months DFS rates were 93, 66 and 46%, respectively.

Identification of factors predictive of relapse in 47 PCFCL patients

Univariate analysis (using non parametric log rank test, considering the first cutaneous relapse) showed that a predominantly small/medium centrocytic cell population ($p=0.008$) was significantly associated with an increased risk of cutaneous relapse (Figure 3b). Although not significant, CD10 expression ($p=0.06$) and CD10/BCL2 co-expression ($p=0.08$) seemed to be potentially related to cutaneous relapse. The other factors studied (age above 60 years, gender, T classification, site involved, first-line therapy, BCL2 expression and rearrangement, presence of a monoclonal *IgH* rearrangement, presence of an identical *IgH* monoclonal rearrangement in skin and blood) did not show any association with the occurrence of cutaneous relapse. In the multivariate analysis, cell morphology (small/medium centrocytes vs large centrocytes and/or centroblasts) was associated with disease recurrence ($p=0.028$). Indeed, patients with small/medium centrocytes-cell infiltrate had higher risk of cutaneous relapse (OR=8.74, 95% CI [2.06-37.09]), compared to patients with lesions made by a predominance of large centrocytes and/or centroblasts. When taking into account all cutaneous relapses for each patient (using a shared gamma-frailty model), univariate analysis also showed that a predominance of small to medium centrocytes ($p=0.004$) was significantly associated with an increased risk of cutaneous relapse (Figure 3d). Although not statistically significant, patients with CD10/BCL2 co-expression showed a higher tendency to have cutaneous relapses ($p=0.19$). In the multivariate analysis using this model, small/medium cell-morphology was also associated with cutaneous recurrence ($p=0.006$), after adjustment on other criteria. Patients with predominantly small/medium centrocytic cell tumour had also higher risk of disease recurrence (OR=7.52, 95% CI [1.76-32.21]) compared to patients with predominance of large centrocytes and/or centroblasts tumour. Secondary extracutaneous spreading was associated with the presence of a *BCL2* rearrangement (Fisher exact test, $p=0.05$), but not with BCL2-CD10 co-expression ($p=0.13$). Out of 4 PCFCL patients harbouring a *BCL2* rearrangement, 2 experienced secondary extracutaneous spreading and among them, one had transformation of lymphoma and died of disease after 77 months of follow-up. This patient was the only PCFCL patient of this study who died of lymphoma.

Correlation of histological features with extracutaneous disease and *BCL2* rearrangement:

In order to determine if all PCFCL or SSIFCL cases should be tested for *BCL2* rearrangement by FISH at diagnosis, we reviewed their histological features.

Among the 7 patients with a *BCL2* rearrangement, only one harboured large cell proliferation (predominance of centroblasts). In other cases harbouring a predominance of small/medium size centrocytes, two types of patterns were observed. Among the seven t(14;18) positive cutaneous FCL (4 PCFCL and 3 SSIFCL), 4 (3 PCFCL and 1 SSIFCL) displayed a Type A pattern and 3 (1 PCFCL and 2 SSIFCL) a Type B pattern. Only one PCFCL without *BCL2* rearrangement also displayed a Type A pattern but was associated with BCL2 and CD10 expression. Among the 6 SSIFCL, 3 displayed a type A pattern (with one t(14;18)-positive case) and 3 showed a type B pattern (with 2 t(14;18)-positive cases). All SSIFCL were characterised by BCL2 and CD10 co-expression. Type A pattern was therefore observed more frequently in cases harbouring a *BCL2* rearrangement ($p=0.03$; Fisher exact test, OR =17; 95% CI[1.97-186.45]), and in SSIFCL cases with extracutaneous involvement at diagnosis ($p=0.02$; Fisher exact test; OR=9.91; 95% CI[1.0042-104.19]). The 7 cases exhibiting a *BCL2* rearrangement expressed BCL2 and CD10. Conversely, 9 PCFCL cases that also co-expressed BCL2 and CD10 did not bear a *BCL2* rearrangement.

Discussion

In this study, we included 53 patients with FCL presenting in the skin and further evaluate if clinical and morphological features may be of diagnostic value between PCFCL and SSIFCL in view of the data obtained by further staging procedures, as in the real-life setting. We also evaluated the diagnostic and prognostic value of *BCL2* gene rearrangement detected by FISH in seven out of 53 patients (13.2%) including 4 out of 47 PCFCL (8.5%) and 3 out of 6 SSIFCL (50%). Then, the presence of a *BCL2* rearrangement was found significantly associated with positivity of initial staging procedures ($p=0.02$) but cannot serve as a diagnostic marker between the two entities as it may be observed in some PCFCL cases. The long follow-up period of time (median of 39 months) also showed that *BCL2* rearrangement was associated with a higher risk of secondary extra-cutaneous spreading in patients with PCFCL ($p=0.05$).

Given these results, our study suggests that FISH could be included as an ancillary procedure in FCL presenting in the skin especially in cases with CD10/BCL2 co-expression. Such co-expression was observed in all SSIFCL and in 35% of PCFCL cases, including 3 out of 5 PCFCL cases with secondary extracutaneous involvement. The single expression of BCL2 observed in more than 50% of PCFCL cases was not found correlated with such clinical evolutive features. In different studies, BCL2 expression in PCFCL have varied considerably ranging from 0% to 86 %^{8,15,20-23}. Moreover, the presence of T cells strongly immunoreactive for the BCL2 protein requires a careful comparison of BCL2, CD3 and CD20 immunostaining as well as the use of a high cutoff (at 50%) to assess the BCL2 positivity of a FCL case. By comparison with indolent cases, architectural pattern of the 11 cases with extracutaneous involvement was not found specific with either a follicular growth pattern with dense infiltration of the dermis (type A pattern) or a focal periadnexal infiltrate (type B pattern), even if type A pattern was observed more frequently in SSIFCL. Five out of these 11

patients were however harbouring a *BCL2* rearrangement. Therefore, only combined *BCL2* and *CD10* expression could be relevant to select patients for FISH testing among any other histological criteria. Analysing a surgical biopsy including the reticular dermis and fat rather than a punch biopsy, as recommended by others³ permitted to increase the reliability of histopathological analysis of the above criteria and FISH testing on a representative tumour sample.

Moreover, bone marrow biopsy has been considered as an “optional” staging procedure in PCFCL according to the ISCL/EORTC recommendations⁶. Indeed, in patients with PCFCL and otherwise negative staging, bone marrow biopsy is often not performed in our national practice²⁴. Only one of our patients (out of 43 patients with bone marrow examination) displayed a bone marrow infiltration as the only evidence of extracutaneous disease. Interestingly, this case displayed a *BCL2/CD10* phenotype associated with *BCL2* rearrangement. In the largest series of Senff et al reported so far, 22 patients among 193 FCL (11%) first presenting in the skin showed a bone marrow infiltration. However, it was the only evidence of extracutaneous disease in only 9 of these 22 patients (9/193, 0.05%) in accordance with the rate (0.023%) observed here. Moreover, the 5-year overall and disease-specific survival of these 9 patients was 44% and 63%, respectively, compared with 84% and 95%, respectively, in 157 patients without extracutaneous disease. These data may support that bone marrow examination should be considered as a systematic staging procedure in patients with FCL presenting in the skin. Nevertheless, isolated bone marrow involvement would not directly change the therapeutic management, as haematologists recommend a “watch-and-wait strategy” FCL without clinical symptoms or cytopenias²⁵. Our data therefore suggest evaluating the presence of *BCL2-CD10* co-expression and *BCL2* rearrangement to determine if these features are recurrently observed by other groups in FCL cases with extracutaneous spreading, primarily or secondarily. The small subset of PCFCL exhibiting a *BCL2* rearrangement seems to harbour a disease closer to nodal FCL, as they seem to be at risk for developing secondary extracutaneous spreading, and should require an adequate clinical monitoring.

FISH-positive cases have been further analysed by PCR amplification of *BCL2-JH* rearrangement using BIOMED-2 protocol. Here, molecular detection provided concordant data on skin specimens with FISH in all cases but one. Moreover the absence of *BCL2* rearrangement in peripheral blood samples of patients with PCFCL permitted to exclude a skin contamination with *BCL2* rearranged circulating B-cells as described in healthy individuals²⁶ but also in patients with FISH-negative PCFCL⁹. For such reason, we would recommend to perform FISH on skin sections rather than PCR to assess the presence of *BCL2* rearrangement within a significant proportion of tumoral cells in order to avoid false positivity due to bystander cells, as previously reported⁹.

Besides *BCL2* rearrangement detection, we also investigated other potential prognostic factors for cutaneous relapse and extra-cutaneous spreading. In this study, 20 out of 47 (42.6%) patients had cutaneous relapse, a rate observed in other studies^{27,28}. As reported by others², clinical features such as age or gender did not influence the disease free survival in PCFCL. We observed that predominant small/medium centrocytic-cell morphology was statistically associated with higher probability of cutaneous relapse(s), in the univariate and the multivariate analysis. We

assessed this prognosis factor both using the usual non parametric log-rank test that considers only the first cutaneous relapse for each patient and also the shared gamma-frailty model that considers all cutaneous relapses for each patient. We also believe that such model could be particularly relevant to the study of disease progression in different types of cutaneous lymphomas where the number of relapses and their time interval may represent an indicator of the disease aggressiveness, not otherwise modeled so far in this field¹⁹.

Finally, our study identified that *BCL2* rearrangement is a rare event in PCFCL (8.5%) but may identify patients at risk of extracutaneous involvement together with other associated features such as type A architectural pattern and *BCL2*-*CD10* co-expression. Alternatively, we suggest searching a *BCL2* rearrangement by FISH using separation probes in cases harbouring the above features. Moreover, small/medium centrocyte morphology, and potentially *BCL2*/*CD10* coexpression, seems to be predictive for a higher risk of cutaneous relapse.

Conflict of interests: none reported.

References

1. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005;105(10):3768-3785.
2. Swerdlow SH. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *IARC Lyon*. 2008.
3. Suárez AL, Pulitzer M, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C, Myskowski PL. Primary cutaneous B-cell lymphomas: part I. Clinical features, diagnosis, and classification. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(3):329.
4. Senff NJ, Hoefnagel JJ, Jansen PM, et al. Reclassification of 300 primary cutaneous B-Cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. *J Clin Oncol*. 2007;25(12):1581-1587.
5. Grange F, Bekkenk MW, Wechsler J, et al. Prognostic factors in primary cutaneous large B-cell lymphomas: a European multicenter study. *J Clin Oncol*. 2001;19(16):3602-3610.
6. Senff NJ, Noordijk EM, Kim YH, et al. European Organization for Research and Treatment of Cancer and International Society for Cutaneous Lymphoma consensus recommendations for the management of cutaneous B-cell lymphomas. *Blood*. 2008;112(5):1600-1609.
7. Geelen FA, Vermeer MH, Meijer CJ, et al. bcl-2 protein expression in primary cutaneous large B-cell lymphoma is site-related. *J Clin Oncol*. 1998;16(6):2080-2085.
8. Child FJ, Russell-Jones R, Woolford AJ, et al. Absence of the t(14;18) chromosomal translocation in primary cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Dermatol*. 2001;144(4):735-744.
9. Vergier B, Belaud-Rotureau M-A, Benassy M-N, et al. Neoplastic cells do not carry bcl2-JH rearrangements detected in a subset of primary cutaneous follicle center B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(6):748-755.
10. Aguilera NS, Tomaszewski MM, Moad JC, Bauer FA, Taubenberger JK, Abbondanzo SL. Cutaneous follicle center lymphoma: a clinicopathologic study of 19 cases. *Mod Pathol*. 2001;14(9):828-835.
11. Lawnicki LC, Weisenburger DD, Aoun P, Chan WC, Wickert RS, Greiner TC. The t(14;18) and bcl-2 expression are present in a subset of primary cutaneous follicular lymphoma: association with lower grade. *Am J Clin Pathol*. 2002;118(5):765-772.
12. Mirza I, Macpherson N, Paproski S, et al. Primary cutaneous follicular lymphoma: an assessment of clinical, histopathologic, immunophenotypic, and molecular features. *J Clin Oncol*. 2002;20(3):647-655.
13. Kim BK, Surti U, Pandya A, Cohen J, Rabkin MS, Swerdlow SH. Clinicopathologic,

immunophenotypic, and molecular cytogenetic fluorescence in situ hybridization analysis of primary and secondary cutaneous follicular lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(1):69-82.

14. Streubel B, Scheucher B, Valencak J, et al. Molecular cytogenetic evidence of t(14;18)(IGH;BCL2) in a substantial proportion of primary cutaneous follicle center lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(4):529-536.
15. Kim YH, Willemze R, Pimpinelli N, et al. TNM classification system for primary cutaneous lymphomas other than mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. 2007;110(2):479-484.
16. Dubus P, Vergier B, Beylot-Barry M, et al. Contribution of histopathologic and molecular analyses to the diagnosis of cutaneous B-cell infiltrates. *Mod Pathol*. 1996;9(12):1147-1155.
17. Belaud-Rotureau M-A, Parrens M, Carrere N, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization is more sensitive than BIOMED-2 polymerase chain reaction protocol in detecting IGH-BCL2 rearrangement in both fixed and frozen lymph node with follicular lymphoma. *Hum Pathol*. 2007;38(2):365-372.
18. Van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-2317.
19. Mazroui Y, Mathoulin-Pelissier S, Soubeyran P, Rondeau V. General joint frailty model for recurrent event data with a dependent terminal event: Application to follicular lymphoma data. *Statistics in Medicine*. 2012.
20. De Leval L, Harris NL, Longtine J, Ferry JA, Duncan LM. Cutaneous b-cell lymphomas of follicular and marginal zone types: use of Bcl-6, CD10, Bcl-2, and CD21 in differential diagnosis and classification. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(6):732-741.
21. Hoefnagel JJ, Vermeer MH, Jansen PM, Fleuren GJ, Meijer CJLM, Willemze R. Bcl-2, Bcl-6 and CD10 expression in cutaneous B-cell lymphoma: further support for a follicle centre cell origin and differential diagnostic significance. *Br J Dermatol*. 2003;149(6):1183-1191.
22. Goodlad JR, Batstone PJ, Hamilton DA, Kernohan NM, Levison DA, White JM. BCL2 gene abnormalities define distinct clinical subsets of follicular lymphoma. *Histopathology*. 2006;49(3):229-241.
23. Swerdlow SH, Quintanilla-Martinez L, Willemze R, Kinney MC. Cutaneous B-cell lymphoproliferative disorders: report of the 2011 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology workshop. *Am J Clin Pathol*. 2013;139(4):515-535.

24. Quereux G, Frot AS, Brocard A, Leux C, Renaut J-J, Dreno B. Routine bone marrow biopsy in the initial evaluation of primary cutaneous B-cell lymphoma does not appear justified. *Eur J Dermatol*. 2009;19(3):216-220.
25. Ghielmini M, Vitolo U, Kimby E, et al. ESMO Guidelines consensus conference on malignant lymphoma 2011 part 1: diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Ann Oncol*. 2013;24(3):561-576.
26. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Briand M, Pottier D, Gauduchon P. Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res*. 2004;64(6):2264-2269.
27. Zinzani PL, Quaglino P, Pimpinelli N, et al. Prognostic factors in primary cutaneous B-cell lymphoma: the Italian Study Group for Cutaneous Lymphomas. *J Clin Oncol*. 2006;24(9):1376-1382.
28. Senff NJ, Hoefnagel JJ, Jansen PM, et al. Reclassification of 300 primary cutaneous B-Cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. *J Clin Oncol*. 2007;25(12):1581-1587.

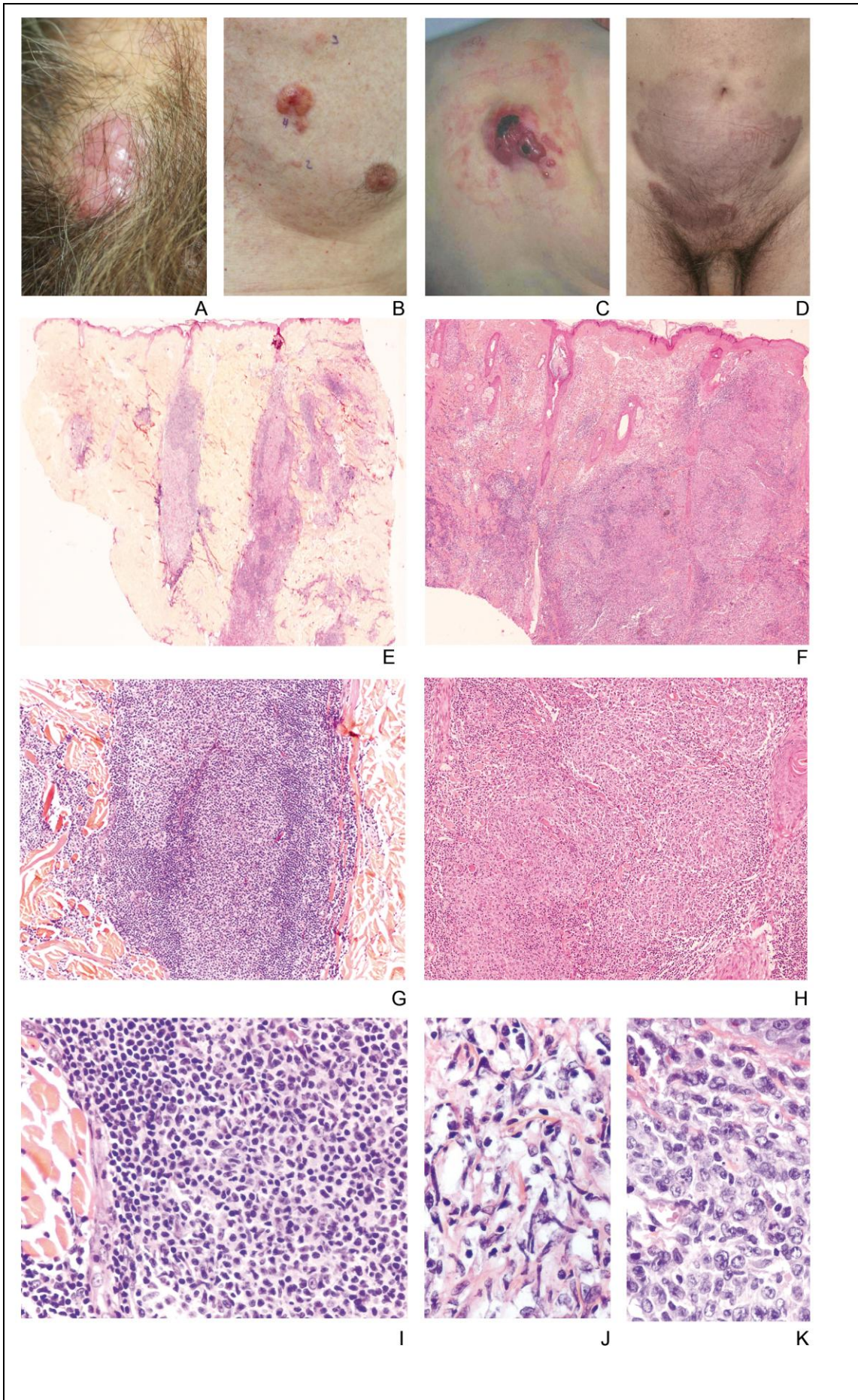


Figure 1

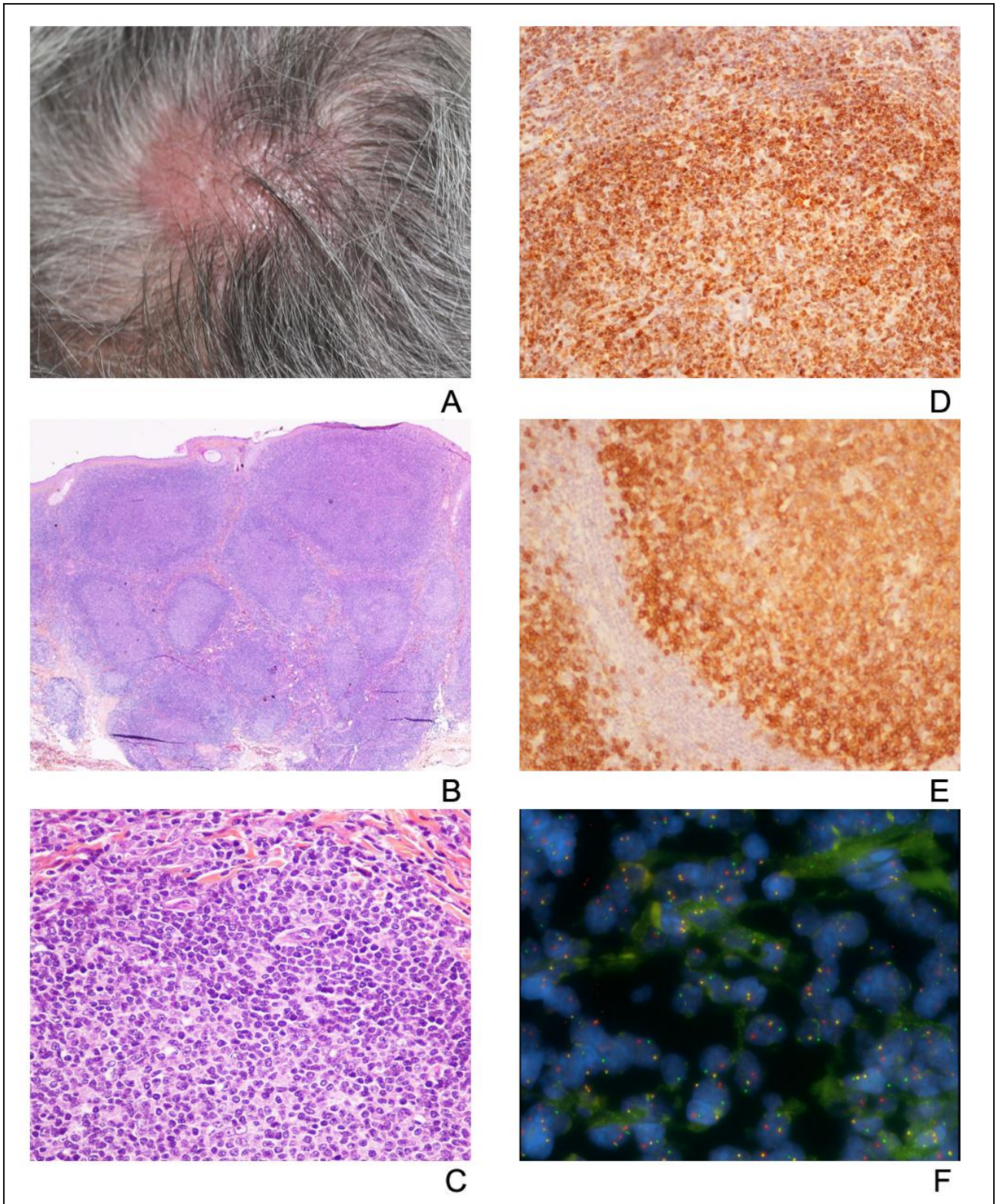


Figure 2

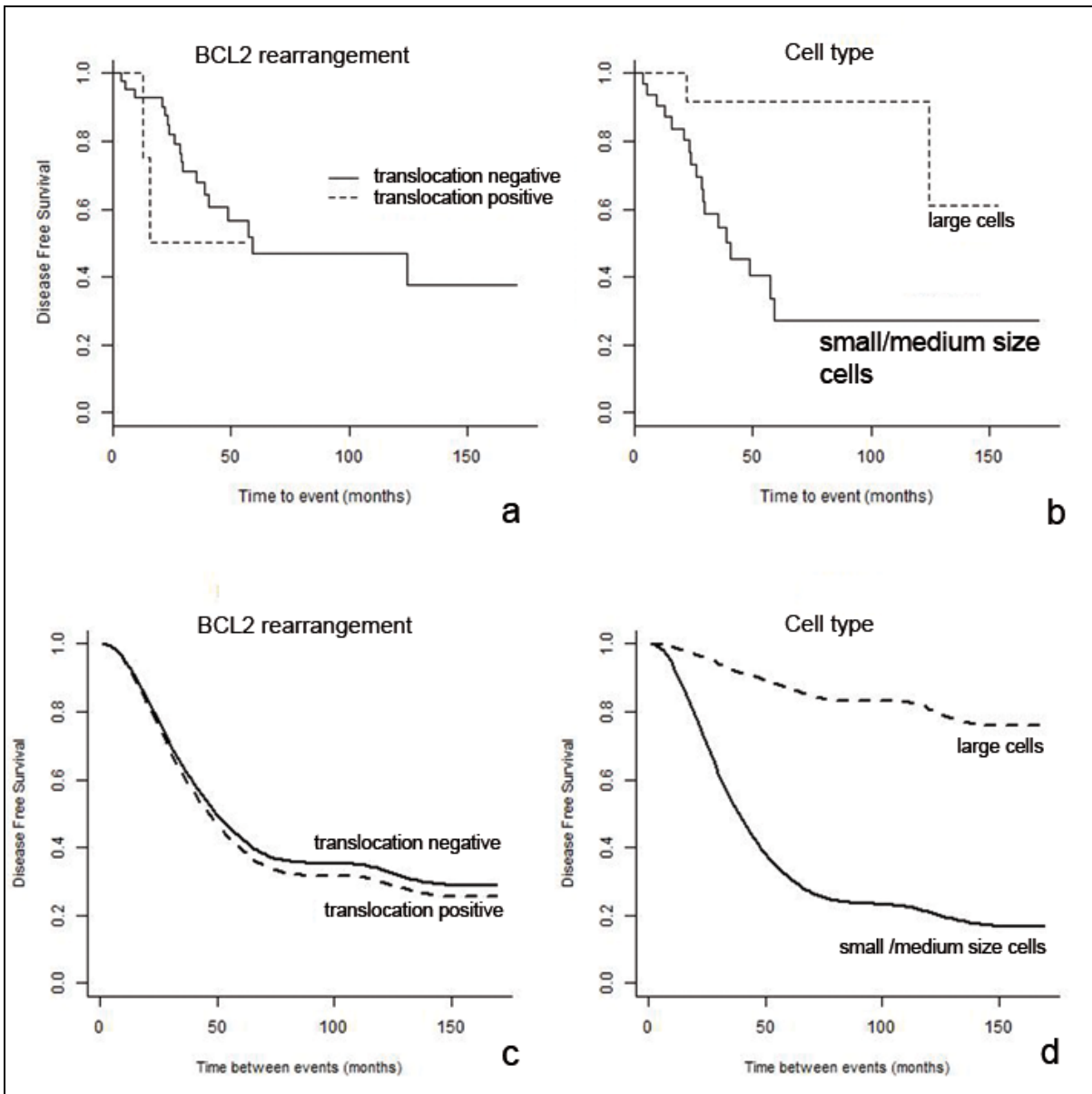


Figure 3

Figure Legends

Figure 1: Clinical and histological features of PCFCL

A, B: clinical features of patients with PCFCL, with head and trunk tumours, surrounded by infiltrated plaque on the trunk (cases with predominance of small/medium size centrocytes).

C, D: clinical features of patients with PCFCL, with a large ulcerated tumour of the chest (C), a deeply infiltrated erythematous plaque of the abdomen (D) (cases with large cell predominance, spindle shaped cell type large centrocytes (C) and large centroblasts (D)).

E, G, I: lymphoid proliferation with nodular or follicular pattern and periadnexal distribution ("type B pattern"), nodules composed with mixture of small/medium size and few large follicle center cells (centrocytes and centroblasts) (E:magnification x10, G: magnification x 100, I: magnification x 400).

F, H: lymphoid proliferation with follicular and diffuse growth pattern, composed by predominance of large cells with a mixture of large centroblasts and centrocytes (F: magnification x 20, H: magnification x100).

J: example of case harbouring follicle centre cells with spindle shaped cell type large centrocytes (magnification x 400).

K: example of case exhibiting large centroblasts predominance (magnification x 400).

Figure 2: Clinical, histological, and FISH features of a PCFCL case with *BCL2* rearrangement positive

A: patient with a unique tumour of the head

B, C: Histological features shows lymphoid proliferation with small to medium size centrocytes, with a dense nodular or follicular growth pattern, resembling "a node in the skin" (type A pattern) (A: magnification x100; B: magnification x400)

D: immunohistochemistry with *BCL2* antibody shows *BCL2* expression by tumour cells.

E: immunohistochemistry with *CD10* antibody shows *CD10* expression.

F: FISH with *BCL2* split probe (DAKO) conducted on a skin FFPE section shows the *BCL2* rearrangement (1Fusion-1Red1-Green split FISH pattern in 85% of nuclei).

Figure 3: Survival function in patients with primary cutaneous follicle center lymphoma (n=47).

a: Kaplan Meier survival function (log rank test) considering the first cutaneous relapse, according to the presence of *BCL2* rearrangement.

b: Kaplan Meier survival function (log rank test) considering the first cutaneous relapse, according to the size of cells.

c: Survival function (Shared gamma-frailty model), considering all cutaneous relapses, according to the presence of *BCL2* rearrangement.

d: Survival function (Shared gamma-frailty model), considering all cutaneous relapses, according to the size of cells.

Table 1: *BCL2* rearrangement (or t(14;18)) detection by PCR and/or FISH in PCFCL

Author (year)	number of patients	t(14 ;18) detection by PCR	t(14 ;18) detection by FISH
Geelen <i>et al</i> (1998)	8	0/8	
Child <i>et al</i> (2001)	5	0/5	
Vergier <i>et al</i> (2004)	30	9/30 (30%)	0/17
Aguilera <i>et al</i> (2001)	17	3/17 (18%)	
Lawnicki <i>et al</i> (2002)	20	4/20 (20%)	
Mirza <i>et al</i> (2002)	32	11/32 (34%)	
Kim <i>et al</i> (2005)	13	4/13 (31%)	
Streubel <i>et al</i> (2006)	27	0/27	11/27 (41%)

PCFCL: primary cutaneous follicle center lymphoma, PCR: polymerase chain reaction, FISH fluorescence *in situ* hybridization

Table 2: Clinical, anatomopathological and biological features of patients of the study.

	PCFCL (n=47)	SSIFCL (n=6)
Median age (range)	57 (27-93)	58 (50-72)
Male (n, %)	27 (57.4)	5 (83.3)
Site of skin involvement (n, %)		
Head and neck	24 (51.1)	2 (33.3)
Chest or upper back	17 (36.2)	3 (50)
Right or left arm	2 (4.2)	0
Leg	0 (0.0)	0
Multiple	4 (8.5)	1 (16.7)
TNM (n, %)		
T1	21 (44.7)	0
T2	20 (42.5)	5 (83.3)
T3	6 (12.8)	1 (16.7)
Initial treatment (n, %)		
Radiation	17 (36.2)	0
Surgery	8 (17.0)	0
Surgery + radiation	7 (14.9)	0
Chemotherapy (R-PC and PC alone)	8 (17.0)	6
Rituximab	6 (12.8)	0
Other treatment	1 (2.1)	0
Cell morphology (n, %)		
Large centrocytes and centroblasts	14 (29.8)	1 (16.7)
Small/medium centrocytes	33 (70.2)	5 (83.3)
BCL2 expression (n, %)		
Yes	25 (53)	4 (66.7)
No	19 (39.1)	2 (33.3)
NA	1 (2.1)	
CD10 expression¹ (n, %)		
Yes	19 (51.3)	6 (100)
BCL2-CD10 co expression	13 (35.1)	6 (100)
No	18 (48.6)	0
NA	10 (27)	
BCL2 rearrangement by FISH (n, %)		
Positive	4 (8.5)	3 (50)
Negative	43 (91.5)	3 (50)
Cutaneous relapse (n, %)		
Yes	20 (42.6)	-
No	27 (57.4)	
Secondary extracutaneous spreading (n, %)		
Yes	5 (10.6)	-
No	42 (89.4)	
Status at last follow-up (n, %)		
CR	41 (87.2)	2 (40)
AWD	4 (8.5)	3 (60)
DD	1 (2.1)	
DA	1 (2.1)	
NA	1	1

PCFCL: primary cutaneous follicle center lymphoma, SSIFCL: secondary skin involvement of follicle center lymphoma, M: male, F: Female, PC: polychemotherapy, R-PC: Rituximab + polychemotherapy, other treatment (Interferon) CR: complete response, AWD: alive with disease, DD: dead of disease; DA: dead of another cause, NA: not-available.

¹: CD10 expression was analyzed on 37 PCFCL cases, out of 47.

Table 3: Clinicopathological features of patients with *BCL2* rearrangement and/or secondary extracutaneous spreading

N° case	Age/ gender	TNM	Bone Marrow	Diagnosis	Site	Therapy	CR	Skin relapse	Secondary extracutaneous spreading (time to onset in months)	Follow-up (months)	Status at last follow-up (months)	Cell morphology	Phenotype BCL2/CD10	FISH <i>BCL2</i> (% nucleus)
1	67/M	T1aN0M0	neg	PCFCL	HN	RT	yes	no	no	19	CR (19)	small/medium	+/+	pos (60%)
2	58/M	T2aN0M0	neg	PCFCL	HN	RTX	yes	yes	yes (29)	77	DD (77)	small/medium	+/+	pos (20%)
3	68/M	T2aN0M0	neg	PCFCL	HN	PC	yes	yes	yes (55)	103	AWD (125)	small/medium	+/+	pos (80%)
4	65/M	T3bN0M0	neg	PCFCL	multiple	RT	yes	no	no	14	DA (56)	large	+/+	pos (85%)
5	55/M	T1aN0M0	neg	PCFCL	HN	Surgery+RT	yes	yes	yes (80)	91	AWD (91)	small/medium	+/+	neg
6	39/F	T2aN0M0	neg	PCFCL	UB	RT	yes	yes	yes (135)	150	CR (150)	small/medium	+/-	neg
7	69/F	T3bN0M0	neg	PCFCL	multiple	PC	yes	yes	yes (134)	147	CR (147)	small/medium	-/+	neg
8	56/M	T2xN0M1	pos	SSIFCL	UB	R-PC	no	-	-	11	AWD (11)	small/medium	+/+	pos (20%)
9	49/M	T2bN3M1	pos	SSIFCL	UB	R-PC	no	-	-	26	AWD (26)	small/medium	+/+	pos (45%)
10	58/M	T3bN3M1	pos	SSIFCL	multiple	PC	NA	NA	-	NA	NA	small/medium	+/+	pos (50%)

F: Female, M: Male, BM: bone marrow, PCFCL: primary cutaneous follicle center lymphoma, SSIFCL: secondary cutaneous follicle center lymphoma, HN: head and neck, UB: upper back, RT: radiotherapy, RTX: rituximab, PC: polychemotherapy, R-PC: rituximab + polychemotherapy, CR: complete response, AWD: alive with disease, DD: died of disease, DA: died of another cause, FISH: Fluorescence in situ hybridization, NA: not available, pos: positive, neg: negative.

PARTIE III: DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. Conclusions et discussion générale

1. Développement d'outils utiles à la prise en charge des malades atteints de lymphomes cutanés B

LCP des centres folliculaires

Concernant les LCP des centres folliculaires, nos travaux ont permis de démontrer que certains lymphomes primitifs cutanés portent effectivement la translocation t(14;18) (ou réarrangement du gène *BCL2*) tel que mise en évidence par FISH alors que la majorité de ces lymphomes ne portent pas cette translocation.

- les demandes pourraient être restreintes aux cas présentant une co-expression de BCL2 et de CD10 (35% des cas dans notre étude). Une étude récente montre qu'en sélectionnant les cas selon l'expression de BCL2 en immunohistochimie, devant une lésion cutanée correspondant à une histologie de lymphome folliculaire, on identifie une t(14;18) dans 63% des cas. Parmi ces cas positifs, 75% correspondraient à de véritables lymphomes cutanés primitifs des centres folliculaires, alors que les 25% restant étaient des localisations cutanées secondaires (Szablewski et al. 2014).

- la positivité de la FISH au moment du diagnostic d'une lésion cutanée correspondant histologiquement à un lymphome folliculaire est corrélée à la positivité du bilan d'extension, incitant à compléter le bilan par une biopsie ostéo-médullaire afin de classer convenablement les malades entre lymphome cutané et lymphome secondaire (à discuter selon les implications thérapeutiques avec les hématologues).

- la positivité de la FISH, chez un patient atteint de LCP-CF ayant donc un bilan d'extension négatif y compris médullaire au diagnostic, semble associée à une progression extra-cutanée secondaire, qui peut être très éloignée du diagnostic (plusieurs années). Dans notre étude l'effectif de malades ayant eu une telle évolution était trop faible pour pouvoir affirmer statistiquement cette affirmation. Une étude publiée récemment conclue que la t(14;18) est rare dans les LCB-CF (4/57 soit 7% dans cette série), et qu'elle n'est pas associée à un mauvais pronostic. Cependant, seules les notions de survie et de rechute étaient précisées. Concernant les rechutes, la notion de progression extra-cutanée n'est pas indiquée, et comprenaient les rechutes cutanées qui concernent 40% des malades. Concernant la survie, même en cas d'extension extra-cutanée, il est rare d'un décès spécifique survenue dans ce lymphome indolent. Cela ne nous semble donc pas étonnant, avec ce type de critères, que le pronostic des patients porteurs ou non de la t(14;18) ne soit pas différent (Abdul-Wahab et al. 2014).

LCBDGC de type jambe

Nos travaux sur la mutation du gène *MYD88*, particulièrement fréquente dans ce type de lymphome agressif, ont permis d'en tirer 2 conclusions potentiellement utiles en pratique clinique:

Une valeur diagnostique de la mutation *MYD88*^{L265P}

En effet, certains cas de lymphome cutané B diffus à grandes cellules sont de diagnostic difficile entre un LCP-CF à prédominance de grandes cellules, ou un LCBDGC-TJ, d'autant plus si la tumeur est localisée à la jambe. Même si la mutation n'est pas associée à 100% au LCBDGC-TJ, elle ne semble pas exister sur les cas testés de LCP-CF (13 cas, dont 7 à grandes cellules). La présence de cette mutation est donc très clairement en faveur d'un LCBDGC-TJ. Bien entendu, le bilan d'extension doit être négatif car cette mutation ne permet pas de faire la différence une localisation cutanée secondaire de LBDGC porteur d'une mutation *MYD88*^{L265P} (29% des cas) et un LCBDGC-TJ.

Une valeur pronostique de la mutation *MYD88*^{L265P}

Nos travaux collaboratifs avec le Groupe Français d'Etude des Lymphomes Cutanés, ayant permis d'étendre la recherche de la mutation à une cohorte nationale annotée, a permis de montrer le valeur pronostique indépendante de cette mutation activatrice des voies NFκB et JAK/STAT. Les patients porteurs de la mutation *MYD88*^{L265P} avaient une survie spécifique à 3 ans plus courte que les patients *MYD88*^{WT} (55,8% versus 81,3%).

Pour la première fois au sein des LBDGC, la présence de la mutation *MYD88*^{L265P} pouvait prédire un mauvais pronostic à ces malades.

Dans les LBDGC ganglionnaires, la mutation de *MYD88* est associée au sous groupe ABC-like, lui même de mauvais pronostic, mais l'analyse au sein de ce sous-groupe n'a pas montré de valeur pronostique (Kim et al. 2014). En revanche, l'analyse de l'expression protéique de *MYD88* en immunohistochimie, est elle corrélée d'une part au sous-type ABC, et à un mauvais pronostic, mais tous LBDGC confondus (pas d'analyse stratifiée du sous-groupe ABC) (Choi et al. 2013). L'expression de *MYD88* n'était pas associée à la présence de la mutation *MYD88*^{L265P} dans cette étude. De manière séparée, les mutations de *CARD11* ou *CD79A/B* ne montraient pas non plus d'impact pronostique. Par contre, au sein du groupe de malades traités de manière homogène par immunochimiothérapie, le fait d'être porteur d'au moins une mutation d'un gène connu pour activer la voie NFκB était fortement associé à un mauvais pronostic (survie globale à 3 ans de 26,1% si une ou plusieurs mutations parmi *MYD88*, *CARD11* ou *CD79A/B*, versus 66,7% en l'absence de mutation) (Bohers et al. 2014).

2. Avancée des connaissances sur l'oncogenèse des LCBDGC de type jambe

Sur le plan fondamental, les différents travaux présentés ici sur l'oncogenèse des LCBDGC-TJ ont permis de pouvoir affirmer certains points:

Contrairement aux autres lymphomes cutanés B, le LCBDGC-TJ partage des anomalies communes avec LBDGC, permettant d'établir un parallèle avec le sous-type ABC. Les anomalies partagées semblent se répartir différemment en terme de prévalence, notamment pour la mutation *MYD88* qui est beaucoup plus fréquente dans le LBDGC-TJ que dans les LBDGC-ABC ganglionnaires (60-70% versus 20-30%). Cette fréquence dans les cutanés se rapproche de celle rapportée dans d'autres LBDGC extra-nodaux comme le SNC ou le testicule, et le profil de mutation des gènes des immunoglobulines pouvait aussi s'approcher de ce qui a été identifié dans les lymphomes du SNC. Le testicule et le SNC sont deux localisations considérées comme des sites de privilège immun, de même que la chambre antérieure de l'œil, ou l'utérus gravide. Ce terme est utilisé pour désigner certains sites de l'organisme qui sont capables de tolérer l'introduction d'antigènes comme une greffe sans provoquer de rejet (donc de réaction inflammatoire). Par exemple le SNC est isolé et protégé de tout ce qui circule dans le sang par une barrière, située au niveau des vaisseaux cérébraux. Dans des conditions normales, les constituants du tissu cérébral n'entrent donc pas en contact avec le système immunitaire. Cependant, alors que qu'auparavant il était admis qu'il existait pas de réaction inflammatoire à ces sites, on sait désormais qu'il existe des réactions immunitaires, que les cellules effectrices peuvent avoir accès à ces sites (pour revue voir Hong and Van Kaer 1999). Le caractère de privilège immun de ces sites pourrait être lié à différents facteurs: la présence d'une barrière physique entre le tissu et la circulation sanguine, la production locale importante de cytokines immunosuppressives comme TGF- β et IL-10, l'expression constitutive de Fas-Ligand qui peut induire l'apoptose des cellules auto agressives, ou le faible drainage lymphatique (Hong and Van Kaer 1999). L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse n'ont pas permis de répondre à une question "simple": pourquoi les LBCDGC-TJ se développent-ils sur la jambe? Le parallèle qui se profile avec les LBDGC touchant des sites de privilège immun nous amène à nous questionner sur le microenvironnement de la peau au niveau de la jambe, et surtout de la jambe des femmes âgées qui sont principalement concernées par ce type de lymphome. Est-ce que l'insuffisance veino-lymphatique, entraînant cliniquement un œdème des membres inférieurs, une modification de l'aspect de la peau qui peut devenir scléreuse, une insuffisance de drainage lymphatique, pourrait participer à créer un environnement favorable à la prolifération d'une cellule tumorale? Est ce que la prolifération se développe à partir d'une population lymphocytaire déjà localisée à la peau (lymphocytes résidents de la peau), ou est-ce ces tumeurs se développent à partir de cellules circulantes qui vont secondairement, du fait d'un adressage particulier et d'un microenvironnement localement favorable, se nicher et se développer au niveau de la jambe? Un article étudiant la valeur l'analyse de la clonalité du BCR par BIOMED2 dans les lymphomes cutanés identifiait un

clone identique entre la tumeur cutanée et les prélèvements sanguins ou tissulaires extra-cutanés de 5 patients atteints de LCBDGC-TJ, alors qu'un bilan d'extension exhaustif avait été effectué et ces cas correspondaient bien à des cas TxN0M0 (Felcht et al. 2011). Ceci est plutôt en faveur de la deuxième hypothèse, argumentant en faveur du fait que le LCBDGC-TJ est une maladie systémique de développement primitivement cutané. La cellule d'origine, issue de la différenciation lymphoïde au niveau de la moelle osseuse, passerait par les tissus et le centre germinatif où elle acquiert les mutations des gènes des immunoglobulines (et probablement du gène *MYD88* ou d'autres oncogènes), puis serait bloquée dans sa différenciation terminale par différents phénomènes comprenant l'activation de *BCL6*, l'inactivation de *BLIMP1*, et un défaut de commutation isotypique. Elle serait adressée secondairement à la peau et se développerait sur ce site car elle y trouverait un environnement favorable. La recherche de la mutation *MYD88* par une technique très sensible comme le NGS ou des PCR allèle spécifique en émulsion ou sur support solide pourraient permettre d'affirmer, en cas de détection de clones mutés circulants chez les malades (et en comparant à une population témoin) que le LCBDGC-TJ est une maladie systémique. Toutefois ceci ne permettrait pas formellement d'identifier le site d'origine par rapport à une circulation de cellules issues de la tumeur cutanée.

Les recherches présentées ici peuvent être complétées par les travaux d'autres équipes, notamment l'analyse des mutations activant NFκB de 10 cas de LCBDGC-TJ. Comme nous pouvions le supposer, d'autres mutations connues dans les LBDGC ont été identifiées: mutations de *CARD11* (1/10), *CD79B* (2/10) (Koens et al. 2013). L'analyse NGS d'une série plus importante de malades semble importante pour définir clairement la répartition de ces mutations, la présence d'autres mutations peut être plus rares, afin d'avoir une idée globale du "paysage génétique" associé aux LCBDGC-TJ. L'analyse des profils d'expression protéiques, comparés aux mutations identifiées, pourrait aussi permettre de déterminer quelle voie moléculaire prédomine, et s'il s'agit d'un groupe homogène ou hétérogène de malades. L'analyse du stroma et du microenvironnement (types cellulaires associées, angiogenèse, cytokines, molécules d'adhésion et matrice extracellulaire) pourrait aussi aider à comprendre pourquoi ce lymphome se développe à ce niveau particulier de la peau.

L'ensemble de ces avancées nous donne cependant un rationnel suffisant pour considérer que ces LCBDGC-TJ doivent être traités comme les LBDGC, et essentiellement comme le sous-type ABC. Cependant, comme nous l'avons vu, la prédominance des voies de signalisation impliquées dans chaque sous-type de LBDGC (nodal, SNC, cutané, ...) peut être différente avec par exemple dans les LCBDGC-TJ, dans l'état actuel des connaissances, prédominance de la voie des récepteurs Toll-like par rapport à la voie JAK/STAT ou du BCR "signaling". Ces différences doivent être prises en compte dans les stratégies thérapeutiques et pour les LCBDGC-TJ, les stratégies ciblées sur la voie des récepteurs Toll-like et sur *MYD88* ou le complexe IRAK1/IRAK4 doivent être privilégiées. Les approches thérapeutiques ciblant les récepteurs Toll-like, en amont de *MYD88*, ne doivent pas être abandonnées puisque des travaux récents montrent que les lymphocytes B mutés pour *MYD88*^{L265P} restent dépendants

de la signalisation via les TLR et sensibles à l'inhibition des TLR9 (Wang et al. 2014). Cependant, les molécules ciblant cette voies sont moins avancées en termes de développement préclinique que d'autres molécules déjà utilisées dans d'autres hémopathies comme l'IBRUTINIB, inhibiteur de la *Bruton's Tyrosine Kinase* (BTK) déjà utilisé dans la leucémie lymphoïde chronique. Des molécules ciblant les récepteurs, protéines kinases et protéines adaptatrices sont en développement, et il existe quasiment une molécule ciblant chaque protéine impliquée dans toutes ces voies moléculaires (pour revue voir Jardin 2014). Des centaines de schémas thérapeutiques sont donc possibles, en association ou non à une immunochimiothérapie, et une réflexion conduite par la connaissance des bases génétiques de la lymphomagenèse de ces hémopathies est indispensable à l'élaboration des essais thérapeutiques.

B. Perspectives

1. Poursuite des travaux afin de préciser l'oncogenèse des LCBDGC-TJ

La poursuite de mes travaux de thèse s'envisage en considérant 3 axes principaux d'études, en dehors des potentielles applications cliniques qui seront développées dans le dernier paragraphe:

- une meilleure caractérisation de la cellule d'origine
- la poursuite de l'exploration des gènes et voies moléculaires impliqués dans l'oncogenèse de ces lymphomes
- la mise en place de modèle d'études

Cellule d'origine: exploration des séquences "switch"

Nos travaux présentés dans la 3^{ème} partie des résultats permettent de présumer que la cellule d'origine est à un stade post centre germinatif. De plus, ils semblent mettre en évidence un défaut de commutation isotypique, avec dans certains cas une recombinaison effectuée sur un allèle, mais pas sur le deuxième, et par conséquent l'expression d'une IgM. Le blocage de différenciation ne semble pas être lié à un défaut au niveau de la "machinerie" nécessaire au switch, étant donné que la délétion de la région C μ -C γ 3 s'est effectuée sur l'allèle non fonctionnel. Il est probable que comme dans les LBDGC de type ABC, il existe dans le LCBDGC-TJ des délétions de régions initiatrices du switch sur l'allèle fonctionnel (région S μ), ou des translocations chromosomiques (Lenz et al. 2007; Ruminy et al. 2011), rendant la commutation de classe impossible sur l'allèle concerné. L'exploration par PCR

et/ou séquençage massif par NGS de cette région S à la recherche de délétions qui pourraient compromettre la survenue du switch semble applicable à nos cas de LCBDGC-TJ.

De plus l'exploration par NGS des réarrangements des gènes *IGH*, *IGK* et *IGL* est devenue accessible à condition d'une analyse bioinformatique appropriée et devrait permettre de compléter nos résultats sur l'homogénéité clonale de ce type de lymphome ainsi que sur l'usage biaisé ou non des gènes VH (VH3 et VH4 notamment). Elle serait particulièrement utile pour le suivi (récidives) et la détection de cellules clonales circulantes.

NGS des LCBDGC-TJ

L'analyse en NGS en séquençage d'exome complet de quelques cas de LCBDGC-TJ est déjà débutée dans le cadre du projet "EXOMIC" à Rouen dans le laboratoire du Pr F. JARDIN, parmi une cohorte de LBDGC. Cette étude devrait permettre d'avoir une idée globale des mutations et voies moléculaires impliquées dans ce lymphome. L'analyse de 10 à 12 paires ADN tumoral/ADN constitutionnel sélectionnés est prévue. Ces analyses pourraient déboucher sur la caractérisation de nouveaux gènes, qui mériteront une caractérisation moléculaire (caractéristiques des mutations, méthylation, effet délétère ou non des mutations, expression) et clinique (corrélations cliniques et pronostiques) qui pourront être réalisée dans notre laboratoire. En fonction des profils mutationnels de ce type de lymphome (nombre élevé ou restreint de mutations communes) nous pourrons les rechercher par une approche de panel de gène sur différentes lésions séquentielles d'un même patient.

Etude des profils d'expression des LCBDGC-TJ

Un projet en cours est l'étude des profils d'expression sur puce Affymetrix (HG U133+ PM Array Strip Kit) des LCBDGC-TJ. L'objectif de ce projet est de comparer les gènes exprimés chez les malades *MYD88*^{L265P} et *MYD88*^{WT}, à la recherche de différences notamment en termes de voies moléculaires utilisées entre ces deux groupes. L'objectif est aussi de tester les lignées de LBDGC de type ABC dont nous disposons (issues de lymphomes ganglionnaires: OCI-Ly3, OCU-Ly10, HLY1, U2932) mutées pour *MYD88* ou non, et de rechercher une lignée s'approchant des LCBDGC-TJ en termes de profil d'expression. L'identification d'une lignée représentative des LCBDGC-TJ serait un élément clé qui permettrait de développer des études fonctionnelles de nouveaux gènes candidats, ou thérapeutiques. L'absence de lignée dans les lymphomes cutanés B est un frein à l'étude approfondie de la biologie de ces lymphomes (*cf infra*).

Exploration du microenvironnement

La cause du développement de ce type de lymphome sur la jambe n'est pas résolue. S'il s'agit bien d'une maladie systémique, la réponse doit se trouver dans l'étude des molécules d'adressage (molécules d'adhésion, expression des récepteurs en surface, chimiokines...) associées à la cellule tumorale et son environnement, et à l'étude de l'environnement particulier qu'est la peau au niveau de la jambe. Les possibilités de prolifération sur le site de la jambe vont dépendre ensuite de l'apport en oxygène - sous-tendu probablement par une néoangiogenèse tumorale - et de l'interaction entre la cellule tumorale et le stroma dans lequel elle se développe. Tous ces aspects peuvent faire l'objet de projets à venir. A l'inverse il est aussi possible que des cellules B normales ou déjà immortalisées à un stade de différenciation spécifique soient attirées sur ce site du fait d'une inflammation ou infection chronique et acquièrent localement des capacités de formation de tumeur.

2. Mise au point de modèles d'étude

Enfin, pour poursuivre ces travaux sur les LCBDGC-TJ, la mise au point de modèles d'étude serait très pertinente. En effet, l'absence de lignée issue de lymphome cutané B rend impossible à l'heure actuelle toute approche fonctionnelle représentative de ce type tumoral. La caractérisation précise des lignées connues issues de tumeurs ganglionnaires de type proche, citées ci-dessus, permettra peut-être d'identifier une lignée ressemblant au LCBDGC-TJ en termes de fond génétique (patron mutationnel), de stade de différenciation (phénotype, hypermutation somatique, absence de switch) et de profil d'expression. Cependant, la technique idéale serait de développer nos propres lignées à partir de la mise en culture de biopsies de malades. La petite taille des biopsies pouvant y contribuer, la rareté de cette affection, et la difficulté de mise en culture et croissance *in vitro* de ces tumeurs rend cette tâche difficile. Cependant, le développement d'autres modèles de culture, par exemple de co-culture en association à des cellules stromales ou des modes de culture appropriés (hypoxie...) pourraient permettre d'obtenir des meilleurs résultats par analogie à d'autres hémopathies où la culture des cellules issues de patients est difficile. De plus, le développement de modèles animaux par xénogreffes de souris serait une étape importante dans le développement de l'étude des lymphomes cutanés B. L'étude de différents modes d'injections (intraveineux, sous-cutané, intra-hépatique, intra-fémoral) sera nécessaire au développement de ces xénogreffes. Nous espérons y parvenir grâce aux moyens mis en œuvre par notre équipe et à des collaborations avec d'autres groupes.

3. Applications cliniques et thérapeutiques

Mise au point de la détection d'ADN tumoral circulant par PCR digitale dans les LBDGC cutanés et ganglionnaires

Il n'existe pas en l'état actuel des connaissances de biomarqueur permettant un suivi du statut de la maladie pendant et après traitement. Grâce aux nouvelles techniques de séquençage de l'ADN tumoral, un panel comprenant plusieurs mutations associées aux lymphomes va être recherché en routine au niveau du tissu tumoral. Le concept de "biopsie liquide" pourrait permettre de détecter et "monitorer" l'évolution des tumeurs en détectant soit la cellule tumorale circulante, soit l'ADN tumoral libre circulant dans la circulation. La biopsie liquide pourrait aussi participer à une médecine stratifiée sur les différentes altérations génomiques ciblées par les nouvelles thérapies, ou la détection précoce des mutations associées à une résistance thérapeutique.

Les premier concept a été de chercher à détecter des cellules tumorales circulantes. Du fait de leur grande rareté dans le sang périphérique, ces cellules requièrent des technologies d'analyse très sensibles comprenant généralement une première étape d'enrichissement puis une étape de détection selon des approches immunologiques, moléculaires ou fonctionnelles. L'étape d'enrichissement développée pour les tumeurs solides repose le plus souvent sur une immunoséparation au moyen de billes magnétiques recouvertes par un anticorps dirigé contre un ou des antigènes d'intérêt spécifique à la cellule tumorale, comme la méthode CellSearch® approuvée aux Etats-Unis qui combine enrichissement et détection actuellement (Tewes et al. 2009). Une autre méthode d'enrichissement est basée sur la filtration discriminant les cellules par critère de taille, permettant ensuite de détecter par exemple des cellules de mélanome exprimant en immunocytochimie de la protéine BRAF mutée (V600E) (Hofman et al. 2013). Une nouvelle méthode de détection est une nanoconstruction ("NanoFlare") d'ADN simple brin couplée à une molécule fluorescente capable de détecter l'expression intracellulaire d'ARNs messagers (Halo et al. 2014). L'inconvénient majeur de ces techniques repose sur le fait qu'il n'existe pas de marqueur spécifique à chaque cellule tumorale.

Dans les tumeurs solides, des méthodes de détection de l'ADN tumoral libre circulant, "relargué" par les cellules tumorales, se développent. Il a été mis en évidence que certaines mutations portées par la tumeur pouvaient être détectées sur un prélèvement de plasma par analyse de l'ADN tumoral circulant, grâce à différentes techniques très sensibles comme le NGS ou la PCR digitale, avec une corrélation à la masse tumorale ou à la réponse clinique notamment dans le cancer du sein (Dawson et al. 2013). Cependant actuellement les concentrations en ADN circulants ne sont actuellement pas utilisées comme outil diagnostique ou pronostique, par manque de standardisation des conditions pré analytiques associées au prélèvements. La standardisation de la méthode de prélèvement du patient, de

la durée de conservation puis des méthodes d'extraction et de dosage permettrait d'établir les seuils nécessaires à la mise en place de ce type de techniques (El Messaoudi et al. 2013). La détection et la quantification de l'ADN tumoral circulant par ces techniques dans les LBDGC cutanés et ganglionnaires pourraient permettre de développer un "biomarqueur" accessible par une simple prise de sang et étant le reflet de du fond génétique de la tumeur, de la réponse au traitement, ou un marqueur précoce de récurrence. La preuve de concept pourrait être établie grâce à la recherche de *MYD88*^{L265P} dans le plasma des patients porteurs de *MYD88*^{L265P} au niveau tumoral, chez des malades atteints de LCBDGC-TJ (du fait de la prévalence élevée de la mutation) et de LBDGC ganglionnaires (du fait de l'incidence plus élevée des LBDGC). La détection d'ADN tumoral circulant dans le plasma de 11/16 patients atteints de LBDGC au diagnostic nous encourage à débiter ce projet (Armand et al. 2013). Si la preuve de concept est établie, la quantification de cet ADN circulant et l'implication clinique de ces dosages pourrait être réalisée grâce à des prélèvements séquentiels de plasma chez des malades "monitorés" au cours de leur plan de soin et surveillance ultérieure. La corrélation des résultats d'analyses de mutations obtenus par biopsie liquide ou par biopsie tissulaire classique pourrait aboutir, si les résultats sont représentatifs, à utiliser ce type d'analyse par biopsie liquide à visée théranostique afin de choisir la thérapie ciblée selon les mutations identifiées sur l'ADN tumoral circulant.

Enfin, la détection par des techniques très sensibles sur le sang périphérique d'une population B lymphocytaire présentant une expression d'IgM et une mutation de *MYD88*, en partant de lymphocytes triés ou non, permettrait de répondre au moment du diagnostic puis du suivi sur la capacité des cellules tumorales à migrer par voie hématogène et éventuellement sur l'origine cutanée ou extra-cutanée de ces cellules.

Essais thérapeutiques

Grâce aux travaux effectués sur les LCBDGC-TJ par notre équipe et d'autres groupes, la lymphomagenèse et les mutations associées au LCBDGC-TJ sont actuellement mieux comprises. L'identification des voies moléculaires impliquées dans cette pathologie rare donne un rationnel cohérent pour permettre à nos patients d'accéder aux molécules actuellement en développement pour d'autres hémopathies, par exemple en s'associant aux essais thérapeutiques ciblant les LBDGC et idéalement en adaptant les molécules proposées au génotype de la tumeur.

La voie des récepteur Toll-like (TLRs) semble être prédominante dans la physiopathologie du LCBDGC-TJ, associée à l'activation chronique du BCR, convergeant ensemble vers l'activation de NFκB. *MYD88*^{L265P} coordonne un complexe de kinases (IRAK1 et IRAK4) qui activent NFκB ce qui induit la production d'IRF4 et d'interféron de type I, mais active aussi la p38 MAPkinase, ce qui avec NFκB promeut la sécrétion d'IL-6, IL-10 (Staudt 2013). IRF4 peut être induit à la fois par l'activation de la voie TLR et BCR (Rui et al. 2011), et est une cible directe de NFκB qui contribue à la survie des cellules par 2 voies: en activant

NFκB via la transactivation de CARD11 et en réprimant la production d'interféron de type I via SPIB et IRF7 (Yang et al. 2012). IRF4 constitue donc une cible thérapeutique sans pour autant être un oncogène, et est un exemple de phénomène "d'addiction" (il est indispensable à la survie des cellules tumorales).

Des travaux récents menés sur des lignées de Waldenström, hémopathie caractérisée par un lymphome lymphoplasmocytaire associée à un pic monoclonal IgM où plus de 90% des cas sont porteurs de la mutation *MYD88*^{L265P} ont montré par co-immunoprécipitation que *MYD88*^{L265P} activait directement BTK, en faisant une cible thérapeutique potentielle non pas en amont mais en aval de *MYD88*^{L265P}. De plus, l'étude des conséquences de la mutation *MYD88*^{L265P} sur des lymphocytes B non tumoraux montre qu'elle induit une division rapide des cellules en l'absence de stimulation des récepteurs Toll-like, prolifération sensible à l'inhibition des TLR montrant qu'il persiste une dépendance vis à vis des TLRs. De plus, les conséquences de la mutation *MYD88*^{L265P} étaient rapidement contrôlée par l'action du régulateur négatif de NFκB TNFAIP3/A20, en induisant une apoptose de ces cellules en prolifération (Wang et al. 2014). Ces travaux indiquent d'une part que les TLRs pourraient représenter une cible thérapeutique en amont de *MYD88*^{L265P}, et d'autre part que des altérations autres que *MYD88* sont probablement nécessaires à la tumeur pour survivre.

Plusieurs molécules pourraient être efficaces, agissant à différents niveaux sur les voies moléculaires impliquées (pour revue voir Jardin 2014; Roschewski et al. 2014).

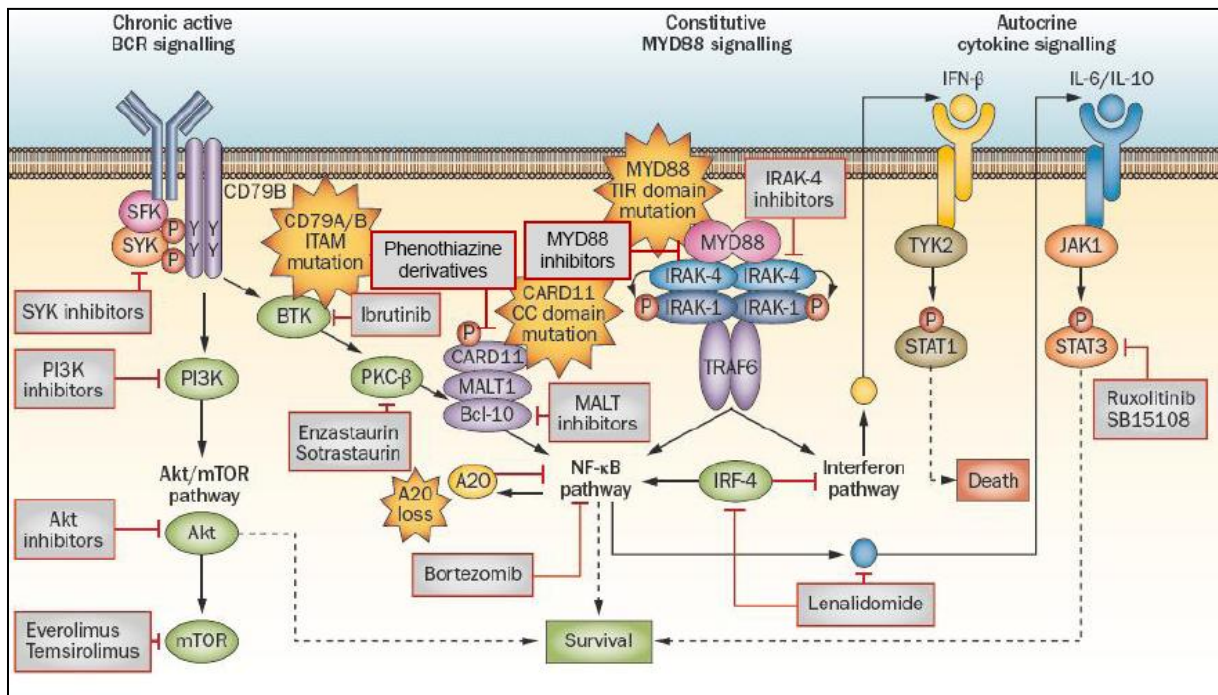


Figure 15: Cibles thérapeutiques en développement dans les lymphomes B diffus à grandes cellules de type ABC. Schéma adapté d'après Roschewski, Staudt et Wilson, Nat Rev. Clin. Oncol, 2014.

Etant donné que les lignées de LBCDGC de type ABC mourraient rapidement lors de l'inhibition de NFκB, les premiers essais thérapeutiques ont testé l'inhibiteur du proteasome

BORTEZOMIB, qui inhibe NFκB en bloquant la dégradation par le protéasome de IκB. Après des essais de phase I/II encourageants pour le sous-type ABC (Dunleavy et al. 2009), des études de phase III randomisées sont en cours pour l'évaluation du BORTEZOMIB en association à une immuno/chimiothérapie. Des inhibiteurs du protéasome de seconde génération sont en développement comme le CARFILZOMIB, plus sélectifs et mieux tolérés (Roschewski et al. 2014).

Le LENALIDOMIDE est un agent anticancéreux oral, immunomodulateur, agissant par différents mécanismes. Le traitement de lignées de LBDGC de type ABC montre qu'il est actif via une inhibition directe d'IRF4 et de SPIB, et indirecte sur la production d'interféron β de manière dépendante de la protéine cereblon (Yang et al. 2012). Les facteurs de transcription IRF4 et SPIB, nécessaires à la survie des cellules, sont au croisement des voies MYD88 et NFκB, via la répression d'IRF7 et d'interféron β d'une part, et activant directement CARD11 et donc NFκB d'autre part (Yang et al. 2012). NFκB induit ensuite la transcription d'IRF4, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif, faisant d'IRF4 une cible thérapeutique idéale. De plus, l'action du LENALIDOMIDE sur les lignées est synergique avec d'autres thérapies ciblées comme le BORTEZOMIB ou l'IBRUTINIB. Un essai de phase II sur 60 patients atteints de LBDGC montre une efficacité sur les types non GC, permettant de "rattraper" la survie sans récurrence à 2 ans des types GC (60% dans le bras R-CHOP + lenalidomide, versus 28% pour le bras R-CHOP seul). Un essai de phase II prospectif est mené par notre centre - NCT01556035 - évaluant l'efficacité du LENALIDOMIDE en monothérapie chez des patients porteurs d'un LBDGC-TJ en rechute après une première ligne thérapeutique d'immunochimiothérapie.

Inhiber la voie du BCR est aussi une cible thérapeutique prometteuse. L'inhibiteur de BTK IBRUTINIB, la SOTRASTAUROIN et l'EZASTAUROIN (inhibiteurs de la protéine kinase C PKC), le FOSATINIB (inhibiteur de SYK), sont en développement. Le plus avancé est l'IBRUTINIB, qui a l'autorisation d'utilisation aux Etats Unis pour la leucémie lymphoïde chronique en rechute et le lymphome du manteau (Autorisation temporaire d'utilisation en France). Il s'agit d'un inhibiteur sélectif de BTK, qui forme une liaison covalente avec la cystéine 481 près du site actif de la protéine (Young et Staudt 2013). Dans le LBDGC, il est en cours d'évaluation en association à d'autres traitements, notamment à un traitement standard par R-CHOP. Des résultats intermédiaires d'une étude de phase 2 incluant 70 patients traités en monothérapie pour un LBDGC montrent une activité préférentielle pour les types ABC, avec un taux de réponse moyen de 40% mais présent quel que soit le statut de CD79b mais variable - 60% pour les mutés versus 37% pour les sauvages - (Wilson et al. ASH 2012). En revanche, les patients porteurs de la mutation *MYD88*^{L265P} n'étaient pas répondeurs qu'en cas d'association à la mutation de CD79b. Les patients porteurs d'une mutation de CARD11 n'étaient pas répondeurs de même que 4 patients porteurs uniquement de la mutation *MYD88*^{L265P}. Cependant, la mise en évidence (*cf supra*) de l'activation directe de BTK par *MYD88*^{L265P} sur des lignées de Waldenström plaide en faveur de la possibilité d'une action d'un inhibiteur de BTK chez un patient porteur de la mutation *MYD88*^{L265P} uniquement.

L'IBRUTINIB est bien toléré cliniquement, et pourra probablement être utilisé en association thérapeutique. Sur des lignées, il existe une synergie lorsque l'on associe l'IBRUTINIB à d'autres thérapeutiques comme le LENALIDOMIDE, des inhibiteurs de BCL2, inhibiteurs de SYK notamment en présence de mutations associées à une résistance à l'IBRUTINIB sur ces lignées (Kuo et al. ASH 2014).

MALT1 fait partie du complexe "CBM" (avec BCL10 et CARD11) essentiel à l'activation de NFκB suite à l'activation du BCR par un antigène. Son activité protéolytique est essentielle à la survie des lignées de LBDGC ABC, et représente ainsi une potentielle cible thérapeutique. Des inhibiteurs spécifiques de MALT1, ainsi que des dérivés de phénothiazine ont montré une activité sur MALT1 *in vitro* et *in vivo* (Nagel et al. 2012; Roschewski et al. 2014).

L'inhibition de la voie JAK-STAT est aussi une cible thérapeutique. Elle peut être activée par MYD88^{L265P} via une boucle autocrine impliquant IL-6, IL-10 et l'interféron β. L'inhibition de STAT3 (par technique de shRNA) sur des modèles de souris porteuses de LBDGC ABC, en stoppant la croissance tumorale, a permis de valider STAT3 comme une cible thérapeutique. Etant donné que STAT3 n'a pas d'activité enzymatique intrinsèque, son inhibition est indirecte en utilisant des molécules inhibant JAK actuellement en développement. Le RUXOLITINIB, inhibiteur de JAK-1 et JAK-2, est actuellement en évalué en phase 2 dans le LBDGC.

Si la voie des TLRs représente une cible thérapeutique idéale dans le LBDGC-TJ du fait de la fréquence des mutations de MYD88, les molécules ciblant cette voie ont un développement préclinique et clinique moins avancé. Cependant, des thérapies inhibant les kinases IRAK semblent prometteuses, notamment IRAK4. Des inhibiteurs de MYD88 ciblant son homodimérisation ont été conçus (Loiarro et al. 2013). Des stratégies ciblant les récepteurs TLRs 7, 8 et 9, par ailleurs en développement pour le traitement du psoriasis, sont en développement sur des LBDGC porteurs de la mutation MYD88^{L265P} et en phase 1/2 dans la maladie de Waldenström (Brenner et al. ASH 2014).

Ces stratégies thérapeutiques seraient à combiner entre elles et/ou avec une immunochimiothérapie afin de bloquer efficacement les différentes voies impliquées dans la survie et la prolifération tumorale. L'étude *in vitro* de la "léthalité synthétique" de ces différentes molécules combinées en elles ou avec une immuno-chimiothérapie pourra aider à concevoir les meilleures stratégies thérapeutiques qui seront utilisées en pratique clinique. Ce concept a été défini initialement comme la combinaison létale de 2 mutations qui sont individuellement compatibles avec la survie, est actuellement appliqué à la pathologie tumorale notamment les LBDGC de type ABC (Yang et al. 2012). La présence d'altérations moléculaires conduisant à la survie et la prolifération des cellules peut conduire la tumeur à être dépendante d'une voie moléculaire associée, annexe mais indispensable à sa survie, qui peut alors faire l'objet d'un ciblage thérapeutique.

Références bibliographiques

- Abdul-Wahab, A, Tang, S-Y, Robson, A, *et al.* (2014). Chromosomal anomalies in primary cutaneous follicle center cell lymphoma do not portend a poor prognosis. *J Am Acad Dermatol* 70: 1010–20.
- Alizadeh, AA, Eisen, MB, Davis, RE, *et al.* (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503–11.
- Armand, P, Oki, Y, Neuberg, DS, *et al.* (2013). Detection of circulating tumour DNA in patients with aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 163: 123–6.
- Barrans, S, Crouch, S, Smith, A, *et al.* (2010). Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 28: 3360–5.
- Barrans, SL, O'Connor, SJM, Evans, PAS, *et al.* (2002). Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 117: 322–32.
- Bastard, C, Deweindt, C, Kerckaert, JP, *et al.* (1994). LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood* 83: 2423–7.
- Belaud-Rotureau, M-A, Marietta, V, Vergier, B, *et al.* (2008). Inactivation of p16INK4a/CDKN2A gene may be a diagnostic feature of large B cell lymphoma leg type among cutaneous B cell lymphomas. *Virchows Arch Int J Pathol* 452: 607–20.
- Berry, R, Chen, Z, McCluskey, J, *et al.* (2011). Insight into the basis of autonomous immunoreceptor activation. *Trends Immunol* 32: 165–70.
- Beylot-Barry, M, Dereure, O, Vergier, B, *et al.* (2010). Prise en charge des lymphomes T cutanés: recommandations du groupe français d'étude des lymphomes cutanés. *Ann Dermatol Vénéréologie* 137: 611–21.
- Bohers, E, Mareschal, S, Bouzelfen, A, *et al.* (2014). Targetable activating mutations are very frequent in GCB and ABC diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 53: 144–53.
- Bradford, PT, Devesa, SS, Anderson, WF, *et al.* (2009). Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood* 113: 5064–73.
- Brenner, L, Arbeit, R, Sullivan, T (2014). IMO-8400, an Antagonist of Toll-like Receptors 7, 8, and 9, in Development for Genetically Defined B-Cell Lymphomas: Safety and Activity in Phase 1 and Phase 2 Clinical Trials. *Abstract, ASH.*

- Cerroni, L, Zöchling, N, Pütz, B, *et al.* (1997). Infection by *Borrelia burgdorferi* and cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Pathol* 24: 457–61.
- Choi, J-W, Kim, Y, Lee, J-H, *et al.* (2013). MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol* 44: 1375–81.
- Choi, WWL, Weisenburger, DD, Greiner, TC, *et al.* (2009). A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 15: 5494–502.
- Coiffier, B (2007). Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 26: 3603–13.
- Coiffier, B, Lepage, E, Briere, J, *et al.* (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346: 235–42.
- Compagno, M, Lim, WK, Grunn, A, *et al.* (2009). Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459: 717–21.
- Copie-Bergman, C, Gaulard, P, Leroy, K, *et al.* (2009). Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: a GELA study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 27: 5573–9.
- Davis, RE, Ngo, VN, Lenz, G, *et al.* (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 463: 88–92.
- Dawson, S-J, Rosenfeld, N, Caldas, C (2013). Circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 369: 93–4.
- Delsol, G (2010). Les anomalies moléculaires dans les lymphomes. *Bull Cancer (Paris)* 97: 1347–64.
- Dijkman, R, Tensen, CP, Buettner, M, *et al.* (2006a). Primary cutaneous follicle center lymphoma and primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type, are both targeted by aberrant somatic hypermutation but demonstrate differential expression of AID. *Blood* 107: 4926–9.
- Dijkman, R, Tensen, CP, Jordanova, ES, *et al.* (2006b). Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals recurrent chromosomal alterations and prognostic parameters in primary cutaneous large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 24: 296–305.
- Dunleavy, K, Pittaluga, S, Czuczman, MS, *et al.* (2009). Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 113: 6069–76.
- Dunn-Walters, D, Thiede, C, Alpen, B, *et al.* (2001). Somatic hypermutation and B-cell lymphoma. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 73–82.

- Edry, E, Melamed, D (2007). Class switch recombination: a friend and a foe. *Clin Immunol Orlando Fla* 123: 244–51.
- El Messaoudi, S, Rolet, F, Mouliere, F, *et al.* (2013). Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 424: 222–30.
- Espinet, B, García-Herrera, A, Gallardo, F, *et al.* (2011). FOXP1 molecular cytogenetics and protein expression analyses in primary cutaneous large B cell lymphoma, leg-type. *Histol Histopathol* 26: 213–21.
- Felcht, M, Booken, N, Stroebel, P, *et al.* (2011). The value of molecular diagnostics in primary cutaneous B-cell lymphomas in the context of clinical findings, histology, and immunohistochemistry. *J Am Acad Dermatol* 64: 135–43, 143.e1–4.
- Ferreri, AJM, Dolcetti, R, Magnino, S, *et al.* (2009). Chlamydial infection: the link with ocular adnexal lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol* 6: 658–69.
- Feugier, P, Van Hoof, A, Sebban, C, *et al.* (2005). Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 23: 4117–26.
- Feuillard, J, Raphaël, M (2000). Différentiation lymphocytaire B et lymphomes périphériques. *Hématologie* 6: 345–59.
- De la Fouchardiere, A, Gazzo, S, Balme, B, *et al.* (2006). Cytogenetic and molecular analysis of 12 cases of primary cutaneous marginal zone lymphomas. *Am J Dermatopathol* 28: 287–92.
- Gascoyne, RD, Adomat, SA, Krajewski, S, *et al.* (1997). Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90: 244–51.
- Gaulard, P, de Leval, L (2011). Follicular helper T cells: implications in neoplastic hematopathology. *Semin Diagn Pathol* 28: 202–13.
- Gellrich, S, Rutz, S, Golembowski, S, *et al.* (2001). Primary cutaneous follicle center cell lymphomas and large B cell lymphomas of the leg descend from germinal center cells. A single cell polymerase chain reaction analysis. *J Invest Dermatol* 117: 1512–20.
- Gonzalez-Aguilar, A, Idbaih, A, Boisselier, B, *et al.* (2012). Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 18: 5203–11.
- Goodlad, JR, Davidson, MM, Hollowood, K, *et al.* (2000). Primary cutaneous B-cell lymphoma and *Borrelia burgdorferi* infection in patients from the Highlands of Scotland. *Am J Surg Pathol* 24: 1279–85.

- Goteri, G, Ranaldi, R, Simonetti, O, *et al.* (2007). Clinicopathological features of primary cutaneous B-cell lymphomas from an academic regional hospital in central Italy: no evidence of *Borrelia burgdorferi* association. *Leuk Lymphoma* 48: 2184–8.
- Grange, F, Beylot-Barry, M, Courville, P, *et al.* (2007). Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type: clinicopathologic features and prognostic analysis in 60 cases. *Arch Dermatol* 143: 1144–50.
- Grange, F, D’Incan, M, Ortonne, N, *et al.* (2010). Prise en charge des lymphomes B cutanés: recommandations du Groupe français d’étude des lymphomes cutanés. *Ann Dermatol Vénérologie* 137: 523–31.
- Grange, F, Joly, P, Barbe, C, *et al.* (2014). Improvement of survival in patients with primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type, in France. *JAMA Dermatol* 150: 535–41.
- Gratzinger, D, Advani, R, Zhao, S, *et al.* (2010). Lymphoma cell VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry predicts poor overall survival in diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy (R-CHOP). *Br J Haematol* 148: 235–44.
- Gratzinger, D, Zhao, S, Tibshirani, RJ, *et al.* (2008). Prognostic significance of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 88: 38–47.
- Gunawardana, J, Chan, FC, Telenius, A, *et al.* (2014). Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Nat Genet* 46: 329–35.
- Hallermann, C, Kaune, KM, Gesk, S, *et al.* (2004). Molecular cytogenetic analysis of chromosomal breakpoints in the IGH, MYC, BCL6, and MALT1 gene loci in primary cutaneous B-cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 123: 213–9.
- Halo, TL, McMahon, KM, Angeloni, NL, *et al.* (2014). NanoFlares for the detection, isolation, and culture of live tumor cells from human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Hans, CP, Weisenburger, DD, Greiner, TC, *et al.* (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103: 275–82.
- Hoefnagel, JJ, Dijkman, R, Basso, K, *et al.* (2005). Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Blood* 105: 3671–8.
- Hofman, V, Ilie, M, Long-Mira, E, *et al.* (2013). Usefulness of immunocytochemistry for the detection of the BRAF(V600E) mutation in circulating tumor cells from metastatic melanoma patients. *J Invest Dermatol* 133: 1378–81.
- Hong, S, Van Kaer, L (1999). Immune privilege: keeping an eye on natural killer T cells. *J Exp Med* 190: 1197–200.

- Irsch, J, Irlenbusch, S, Radl, J, *et al.* (1994). Switch recombination in normal IgA1+ B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1323–7.
- Jardin, F (2014). Next generation sequencing and the management of diffuse large B-cell lymphoma: from whole exome analysis to targeted therapy. *Discov Med* 18: 51–65.
- Jardin, F, Jais, J-P, Molina, T-J, *et al.* (2010). Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study. *Blood* 116: 1092–104.
- Jardin, F, Ruminy, P, Parmentier, F, *et al.* (2004). Mutations somatiques du gène BCL-6 et oncogénèse des lymphomes B. *Hématologie* 10: 47–58.
- Jeelall, YS, Horikawa, K (2011). Oncogenic MYD88 mutation drives Toll pathway to lymphoma. *Immunol Cell Biol* 89: 659–60.
- Jima, DD, Zhang, J, Jacobs, C, *et al.* (2010). Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs. *Blood* 116: e118–27.
- Kato, M, Sanada, M, Kato, I, *et al.* (2009). Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 459: 712–6.
- Kim, BK, Surti, U, Pandya, A, *et al.* (2005). Clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular cytogenetic fluorescence in situ hybridization analysis of primary and secondary cutaneous follicular lymphomas. *Am J Surg Pathol* 29: 69–82.
- Kim, S-W, Ramasamy, K, Bouamar, H, *et al.* (2012). MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- κ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 7865–70.
- Kim, Y, Ju, H, Kim, DH, *et al.* (2014). CD79B and MYD88 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol* 45: 556–64.
- Klein, U, Casola, S, Cattoretti, G, *et al.* (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 7: 773–82.
- Klein, U, Dalla-Favera, R (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8: 22–33.
- Klein, U, Rajewsky, K, Küppers, R (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188: 1679–89.
- Kluin, P, Schuurin, E (2011). Molecular cytogenetics of lymphoma: where do we stand in 2010? *Histopathology* 58: 128–44.
- Kluk, MJ, Chapuy, B, Sinha, P, *et al.* (2012). Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PLoS One* 7: e33813.

- Koens, L, Vermeer, MH, Willemze, R, *et al.* (2010). IgM expression on paraffin sections distinguishes primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type from primary cutaneous follicle center lymphoma. *Am J Surg Pathol* 34: 1043–8.
- Koens, L, Zoutman, WH, Ngarmliertsirichai, P, *et al.* (2013). Nuclear Factor- κ B Pathway-Activating Gene Aberrancies in Primary Cutaneous Large B-Cell Lymphoma, Leg Type. *J Invest Dermatol.*
- Kraan, W, Horlings, HM, van Keimpema, M, *et al.* (2013). High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer J* 3: e139.
- Kuo, H-P, Crowley, R, Xue, L, *et al.* (2014). Combination of Ibrutinib and BCL-2 or SYK Inhibitors in Ibrutinib Resistant ABC-Subtype of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Abstract ASH.*
- Küppers, R, Dalla-Favera, R (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20: 5580–94.
- Lawrence, MS, Stojanov, P, Mermel, CH, *et al.* (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505: 495–501.
- LeBien, TW (2000). Fates of human B-cell precursors. *Blood* 96: 9–23.
- LeBien, TW, Tedder, TF (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112: 1570–80.
- Lenz, G, Davis, RE, Ngo, VN, *et al.* (2008a). Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 319: 1676–9.
- Lenz, G, Nagel, I, Siebert, R, *et al.* (2007). Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 204: 633–43.
- Lenz, G, Staudt, LM (2010). Aggressive lymphomas. *N Engl J Med* 362: 1417–29.
- Lenz, G, Wright, G, Dave, SS, *et al.* (2008b). Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 359: 2313–23.
- De Leval, L, Harris, NL, Longtine, J, *et al.* (2001). Cutaneous b-cell lymphomas of follicular and marginal zone types: use of Bcl-6, CD10, Bcl-2, and CD21 in differential diagnosis and classification. *Am J Surg Pathol* 25: 732–41.
- Lohr, JG, Stojanov, P, Lawrence, MS, *et al.* (2012). Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3879–84.
- Loiarro, M, Ruggiero, V, Sette, C (2013). Targeting the Toll-like receptor/interleukin 1 receptor pathway in human diseases: rational design of MyD88 inhibitors. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 13: 222–6.

- Lossos, IS, Jones, CD, Warnke, R, *et al.* (2001). Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 98: 945–51.
- Lukowsky, A, Marchwat, M, Sterry, W, *et al.* (2006). Evaluation of B-cell clonality in archival skin biopsy samples of cutaneous B-cell lymphoma by immunoglobulin heavy chain gene polymerase chain reaction. *Leuk Lymphoma* 47: 487–93.
- Mandelbaum, J, Bhagat, G, Tang, H, *et al.* (2010). BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 18: 568–79.
- Martínez-Trillos, A, Pinyol, M, Navarro, A, *et al.* (2014). Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood* 123: 3790–6.
- Matthias, P, Rolink, AG (2005). Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol* 5: 497–508.
- McCabe, MT, Graves, AP, Ganji, G, *et al.* (2012). Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 2989–94.
- Meyer, PN, Fu, K, Greiner, TC, *et al.* (2011). Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 29: 200–7.
- Mirza, I, Macpherson, N, Paproski, S, *et al.* (2002). Primary cutaneous follicular lymphoma: an assessment of clinical, histopathologic, immunophenotypic, and molecular features. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 20: 647–55.
- Morin, RD, Johnson, NA, Severson, TM, *et al.* (2010). Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 42: 181–5.
- Morin, RD, Mendez-Lago, M, Mungall, AJ, *et al.* (2011). Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 476: 298–303.
- Morin, RD, Mungall, K, Pleasance, E, *et al.* (2013). Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood* 122: 1256–65.
- Morlon, L. Intérêt de l'immunophénotypage plasmocytaire dans le myélome multiples, 210 p. Thèse : Pharmacie : Nancy I : 2010.
- Muramatsu, M, Kinoshita, K, Fagarasan, S, *et al.* (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102: 553–63.
- Nagel, D, Spranger, S, Vincendeau, M, *et al.* (2012). Pharmacologic inhibition of MALT1 protease by phenothiazines as a therapeutic approach for the treatment of aggressive ABC-DLBCL. *Cancer Cell* 22: 825–37.

- Ngo, VN, Young, RM, Schmitz, R, *et al.* (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 470: 115–9.
- Pasqualucci, L (2013). The genetic basis of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Hematol* 20: 336–44.
- Pasqualucci, L, Compagno, M, Houldsworth, J, *et al.* (2006). Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 203: 311–7.
- Pasqualucci, L, Dalla-Favera, R (2014). SnapShot: diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 25: 132–132.e1.
- Pasqualucci, L, Dominguez-Sola, D, Chiarenza, A, *et al.* (2011a). Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 471: 189–95.
- Pasqualucci, L, Migliazza, A, Basso, K, *et al.* (2003). Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 101: 2914–23.
- Pasqualucci, L, Migliazza, A, Fracchiolla, N, *et al.* (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11816–21.
- Pasqualucci, L, Neumeister, P, Goossens, T, *et al.* (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412: 341–6.
- Pasqualucci, L, Trifonov, V, Fabbri, G, *et al.* (2011b). Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet* 43: 830–7.
- Perez, M, Pacchiarotti, A, Frontani, M, *et al.* (2010). Primary cutaneous B-cell lymphoma is associated with somatically hypermutated immunoglobulin variable genes and frequent use of VH1-69 and VH4-59 segments. *Br J Dermatol* 162: 611–8.
- Peyrade, F, Jardin, F, Thieblemont, C, *et al.* (2011). Attenuated immunochemotherapy regimen (R-miniCHOP) in elderly patients older than 80 years with diffuse large B-cell lymphoma: a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 12: 460–8.
- Pfeifer, M, Grau, M, Lenze, D, *et al.* (2013). PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 12420–5.
- Pham-Ledard, A, Prochazkova-Carlotti, M, Vergier, B, *et al.* (2010). IRF4 expression without IRF4 rearrangement is a general feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol* 130: 1470–2.
- Radbruch, A, Müller, W, Rajewsky, K (1986). Class switch recombination is IgG1 specific on active and inactive IgH loci of IgG1-secreting B-cell blasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 3954–7.

- Radbruch, A, Sablitzky, F (1983). Deletion of Cmu genes in mouse B lymphocytes upon stimulation with LPS. *EMBO J* 2: 1929–35.
- Rogozin, IB, Diaz, M (2004). Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G:C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably reflects a two-step activation-induced cytidine deaminase-triggered process. *J Immunol Baltim Md 1950* 172: 3382–4.
- Roschewski, M, Staudt, LM, Wilson, WH (2014). Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol* 11: 12–23.
- Rosenwald, A, Wright, G, Chan, WC, *et al.* (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346: 1937–47.
- Rosenwald, A, Wright, G, Leroy, K, *et al.* (2003). Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 198: 851–62.
- Roulland, S, Navarro, J-M, Grenot, P, *et al.* (2006). Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med* 203: 2425–31.
- Rui, L, Schmitz, R, Ceribelli, M, *et al.* (2011). Malignant pirates of the immune system. *Nat Immunol* 12: 933–40.
- Ruminy, P, Etancelin, P, Couronné, L, *et al.* (2011). The isotype of the BCR as a surrogate for the GCB and ABC molecular subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 25: 681–8.
- Savage, KJ, Johnson, NA, Ben-Neriah, S, *et al.* (2009). MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 114: 3533–7.
- Schneider, C, Pasqualucci, L, Dalla-Favera, R (2011). Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Diagn Pathol* 28: 167–77.
- Schreuder, MI, Hoefnagel, JJ, Jansen, PM, *et al.* (2005). FISH analysis of MALT lymphoma-specific translocations and aneuploidy in primary cutaneous marginal zone lymphoma. *J Pathol* 205: 302–10.
- Scott, DW, Wright, GW, Williams, PM, *et al.* (2014). Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* 123: 1214–7.
- Senff, NJ, Hoefnagel, JJ, Jansen, PM, *et al.* (2007). Reclassification of 300 primary cutaneous B-Cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 25: 1581–7.

- Senff, NJ, Kluin-Nelemans, HC, Willemze, R (2008a). Results of bone marrow examination in 275 patients with histological features that suggest an indolent type of cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 142: 52–6.
- Senff, NJ, Noordijk, EM, Kim, YH, *et al.* (2008b). European Organization for Research and Treatment of Cancer and International Society for Cutaneous Lymphoma consensus recommendations for the management of cutaneous B-cell lymphomas. *Blood* 112: 1600–9.
- Senff, NJ, Zoutman, WH, Vermeer, MH, *et al.* (2009). Fine-mapping chromosomal loss at 9p21: correlation with prognosis in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol* 129: 1149–55.
- Shaffer, AL, Lin, KI, Kuo, TC, *et al.* (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17: 51–62.
- Shaffer, AL, Young, RM, Staudt, LM (2012). Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol* 30: 565–610.
- Shaffer, AL, Yu, X, He, Y, *et al.* (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 13: 199–212.
- Staudt, LM (2010). Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000109.
- Staudt, LM (2013). II. Therapy of DLBCL based on genomics. *Hematol Oncol* 31 Suppl 1: 26–8.
- Streubel, B, Lamprecht, A, Dierlamm, J, *et al.* (2003). T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* 101: 2335–9.
- Streubel, B, Scheucher, B, Valencak, J, *et al.* (2006). Molecular cytogenetic evidence of t(14;18)(IGH;BCL2) in a substantial proportion of primary cutaneous follicle center lymphomas. *Am J Surg Pathol* 30: 529–36.
- Streubel, B, Vinatzer, U, Lamprecht, A, *et al.* (2005). T(3;14)(p14.1;q32) involving IGH and FOXP1 is a novel recurrent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Leukemia* 19: 652–8.
- Suárez, AL, Pulitzer, M, Horwitz, S, *et al.* (2013a). Primary cutaneous B-cell lymphomas: part I. Clinical features, diagnosis, and classification. *J Am Acad Dermatol* 69: 329.e1–13; quiz 341–2.
- Suárez, AL, Querfeld, C, Horwitz, S, *et al.* (2013b). Primary cutaneous B-cell lymphomas: part II. Therapy and future directions. *J Am Acad Dermatol* 69: 343.e1–11; quiz 355–6.
- Swerdlow, SH (2008). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *IARC Lyon*.

- Szablewski, V, Oro, S, Baia, M, *et al.* FISH studies in cutaneous follicle center lymphomas with primary cutaneous presentation highlights frequent BCL2-IGH rearrangements in BCL2+ and possible del 1p36 in pure and primary cutaneous lymphomas. A study of 19 BCL2 positive and 6 BCL2 negative cases. *2014 Abstract 043 - EORTC New Perspectives in Cutaneous Lymphomas.*
- Takino, H, Li, C, Hu, S, *et al.* (2008). Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma: a molecular and clinicopathological study of cases from Asia, Germany, and the United States. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 21: 1517–26.
- Tewes, M, Aktas, B, Welt, A, *et al.* (2009). Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat* 115: 581–90.
- Troppan, K, Wenzl, K, Deutsch, A, *et al.* (2014). MicroRNAs in diffuse large B-cell lymphoma: implications for pathogenesis, diagnosis, prognosis and therapy. *Anticancer Res* 34: 557–64.
- Vergier, B, Belaud-Rotureau, M-A, Benassy, M-N, *et al.* (2004). Neoplastic cells do not carry bcl2-JH rearrangements detected in a subset of primary cutaneous follicle center B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 28: 748–55.
- Vermeer, MH, Geelen, FA, van Haselen, CW, *et al.* (1996). Primary cutaneous large B-cell lymphomas of the legs. A distinct type of cutaneous B-cell lymphoma with an intermediate prognosis. Dutch Cutaneous Lymphoma Working Group. *Arch Dermatol* 132: 1304–8.
- Walsh, SH, Rosenquist, R (2005). Immunoglobulin gene analysis of mature B-cell malignancies: reconsideration of cellular origin and potential antigen involvement in pathogenesis. *Med Oncol Northwood Lond Engl* 22: 327–41.
- Wang, JQ, Jeelall, YS, Beutler, B, *et al.* (2014). Consequences of the recurrent MYD88(L265P) somatic mutation for B cell tolerance. *J Exp Med* 211: 413–26.
- Weller, S, Braun, MC, Tan, BK, *et al.* (2004). Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104: 3647–54.
- Weller, S, Reynaud, C-A, Weill, J-C (2005). Splenic marginal zone B cells in humans: where do they mutate their Ig receptor? *Eur J Immunol* 35: 2789–92.
- Wiesner, T, Obenauf, AC, Geigl, JB, *et al.* (2009). 9p21 deletion in primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type, may escape detection by standard FISH assays. *J Invest Dermatol* 129: 238–40.
- Wiesner, T, Streubel, B, Huber, D, *et al.* (2005). Genetic aberrations in primary cutaneous large B-cell lymphoma: a fluorescence in situ hybridization study of 25 cases. *Am J Surg Pathol* 29: 666–73.

- Willemze, R, Jaffe, ES, Burg, G, *et al.* (2005). WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 105: 3768–85.
- Wilson, W, Gerecitano, J, Goy, A, *et al.* (2012). The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor, Ibrutinib (PCI-32765), Has Preferential Activity in the ABC Subtype of Relapsed/Refractory De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Interim Results of a Multicenter, Open-Label, Phase 2 Study. *Abstract 54th ASH*.
- Xiao, C, Srinivasan, L, Calado, DP, *et al.* (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 9: 405–14.
- Xu, L, Hunter, ZR, Yang, G, *et al.* (2013). MYD88 L265P in Waldenstrom macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood* 121: 2051–8.
- Yang, G, Zhou, Y, Liu, X, *et al.* (2013). A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 122: 1222–32.
- Yang, Y, Shaffer, AL, Emre, NCT, *et al.* (2012). Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 21: 723–37.
- Ye, BH, Cattoretti, G, Shen, Q, *et al.* (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 16: 161–70.
- Ye, BH, Lista, F, Lo Coco, F, *et al.* (1993). Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 262: 747–50.
- Young, KH, Leroy, K, Møller, MB, *et al.* (2008). Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood* 112: 3088–98.
- Young, RM, Staudt, LM (2013). Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov* 12: 229–43.
- Zhang, J, Grubor, V, Love, CL, *et al.* (2013). Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1398–403.
- Zhang, Y, Gostissa, M, Hildebrand, DG, *et al.* (2010). The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Adv Immunol* 106: 93–133.

Titre : oncogénèse des lymphomes cutanés B

Résumé : Les lymphomes cutanés primitifs B comprennent 2 formes indolentes (lymphomes des centres folliculaires et de la zone marginale) et une forme clinique agressive, le lymphome B diffus à grandes cellules de type jambe. Si le lymphome des centres folliculaires ne présente le plus souvent pas la translocation t(14;18) à l'origine d'une dérégulation de BCL2 caractéristique des lymphomes folliculaires ganglionnaires, elle peut être identifiée en FISH dans 8,7% des cas et représenter un risque d'extension extra-cutanée. En revanche, l'étude de l'oncogénèse des lymphomes B de type jambe révèle des mécanismes communs d'oncogénèse avec les lymphomes B diffus à grandes cellules ganglionnaires, avec une répartition différente des altérations. Notamment, la mutation du gène *MYD88*^{L265P} qui encode une protéine adaptatrice de la voie des Toll-like récepteurs responsable de l'activation constitutive de la voie NFκB, est très fréquemment observée (69% des cas) et est associée à une survie spécifique plus courte. De plus, contrairement aux autres lymphomes cutanés B, les cellules tumorales sont porteuses de multiples anomalies comme des translocations ou des délétions. D'autres arguments issus de l'analyse des séquences des gènes des immunoglobulines nous permettent de présumer que la cellule d'origine est un lymphocyte B mature, post-centre germinatif. Le fort taux de mutations identifiées reflète l'hypermutation somatique acquise à l'occasion du passage par le centre germinatif, mais l'expression d'un isotype primaire d'anticorps (IgM) suggère un blocage de la différenciation plasmocytaire terminale notamment pour la commutation isotypique.

Mots clés : lymphome cutané B, oncogénèse, mutation

Title : B-cell cutaneous lymphomas oncogenesis

Abstract : Cutaneous B-cell lymphomas are represented by indolent B-cell lymphomas (follicle center and marginal zone), and primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type which is characterized by an aggressive behavior. Primary cutaneous follicle center lymphoma usually do not harbor the t(14;18) translocation, which is characteristic of nodal follicular lymphoma and conduct to BCL2 overexpression. However, it can be observed by FISH in 8.7% of cutaneous cases and seems to be associated with extra-cutaneous disease. In contrast, primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type shows common genetic alterations with its nodal counterpart diffuse large B-cell lymphoma, suggestive of common oncogenesis pathways, with distinct frequencies and repartition of mutations. Especially, the *MYD88*^{L265P} mutation that encodes an important adaptator protein of the Toll-like receptor pathway, activating NFκB, is very frequent (69% of cases) and associated with a shorter specific survival. Moreover, contrary to indolent primary cutaneous B-cell lymphoma, tumour cells often harbor multiple genetic alterations as translocations and deletions. The analysis of the immunoglobulin genes sequences led us to suppose that the cell of origin could be a post germinal-center mature B-cell. Highly mutated sequences are the reflection of the germinal center passage, but IgM expression suggests a terminal differentiation blockage, notably with a class switch recombination defect.

Keywords : cutaneous B-cell lymphoma, oncogenesis, mutation

Unité de recherche : EA2406 Histologie et pathologie moléculaire des tumeurs

Université de Bordeaux - Bat 3B, Niveau 2, Campus Carreire-Zone Nord.

146, rue Léo Saignat

33076 BORDEAUX, FRANCE