

**UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE PHARMACIE**

ANNÉE 2013

N°032

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le jeudi 3 octobre 2013

Par **Emmanuelle RAULT**

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 6 mai 1987 tient lieu de :

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Lymphomes B agressifs avec réarrangements de *MYC*,
Revue de la littérature et étude d'une cohorte régionale**

Président du jury : Monsieur le Professeur Jean-Marie BARD

Directeur de thèse : Madame le Docteur Marion EVEILLARD

Membres du jury : Madame le Professeur Marie Christine BENE
Madame le Docteur Catherine GODON
Monsieur le Professeur Steven LE GOUILL
Madame le Docteur Anne MOREAU

Remerciements

Au Professeur Jean-Marie Bard pour l'honneur qu'il me fait de présider ce jury de thèse et de juger mon travail.

Au Docteur Marion Eveillard, ma directrice de thèse, pour m'avoir fait confiance et proposé ce sujet. Merci pour ton accompagnement, ta disponibilité, tes conseils et ta gentillesse.

Au Professeur Marie Christine Béné pour son engagement dans ce projet, la création de la base de données et la relecture qui ont contribué à améliorer la qualité de ce travail. Merci également d'être membre de ce jury.

Au Docteur Catherine Godon pour sa disponibilité, ses explications et sa gentillesse. Merci pour ton aide précieuse pendant les heures passées devant des caryotypes incompréhensibles et pour ta présence dans ce jury.

Au Professeur Steven Le Gouill pour m'avoir guidée dans ce travail et pour ses commentaires. Merci également d'être présent dans ce jury.

Au Docteur Anne Moreau pour ses explications, le temps passé à parcourir les dossiers et à réaliser des analyses complémentaires pour les besoins de ce travail. Merci également de faire partie de ce jury.

Aux Docteurs Olivier Theisen et Laurence Lodé, ainsi qu'à Nelly Robillard, pour leur aide et leurs réponses.

A Amandine, co-interne clinicienne et voisine ce semestre. Merci pour ta gentillesse, tes encouragements et tes conseils.

Aux techniciens de cytogénétique : Audrey, Axelle, Hélène, Nadège, Aurélien et Pierre-Yves. Merci pour le temps passé à me former dans le secteur, pour votre aide et votre bonne humeur.

Aux personnels des secrétariats d'hémato clinique du centre Catherine de Sienne de Nantes, des CH de Vannes, Lorient et Quimper ainsi qu'au secrétariat d'anapath de Saint Nazaire pour m'avoir fait parvenir les courriers et résultats relatifs aux patients de cette étude.

Au Docteur Richard Garand, jeune retraité avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant 2 semestres. Merci de m'avoir transmis la passion de la cytologie et pour tout ce savoir partagé au microscope.

A l'ensemble des équipes du laboratoire d'hématologie du CHU de Nantes pour leur sympathie pendant ces semestres passés avec eux.

A toute l'équipe du laboratoire de La Roche sur Yon qui m'a accueillie pour ce dernier semestre. Merci pour votre sympathie, pour la bonne ambiance qui règne au labo, pour votre confiance, pour la liberté que j'ai eu de privilégier le secteur d'hémato et pour le temps libéré pour cette thèse.

A Laurent, pour tout ce qu'il m'apporte, sa présence et son soutien.

A mes parents sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour votre présence, votre patience et votre soutien depuis toujours.

A mon frère, pour sa présence et sa complicité.

A mes grands-parents et à toute ma famille pour leur soutien.

A mes amis de toujours, Aurore, Thomas et Maud, pour leur présence, leur soutien et leur complicité.

A mes amis de lycée, pour les moments que nous partageons encore aujourd'hui.

A mes amis de la fac de Caen et à tous mes co-internes rennais et nantais, pour les bons moments passés au cours de ces années d'étude et d'internat.

Table des matières

1.	Introduction	1
2.	Généralités.....	3
2.1.	Physiopathologie des lymphomes	4
2.1.1.	Rappels sur la lymphopoïèse B	4
2.1.2.	Facteurs de risque des lymphomes.....	6
2.2.	Les lymphomes B diffus à grandes cellules	7
2.2.1.	Définition	7
2.2.2.	Epidémiologie	7
2.2.3.	Diagnostic clinique.....	7
2.2.4.	Classification anatomo-pathologique.....	8
2.2.5.	Cytologie et immunophénotypage	11
2.2.6.	Cytogénétique.....	11
2.2.7.	Bilan d'extension	13
2.2.8.	Facteurs pronostiques	14
➤	Facteurs pronostiques cliniques	14
➤	Facteurs pronostiques liés au phénotype.....	17
➤	Facteurs pronostiques liés à la cytogénétique	18
2.2.9.	Traitement des DLBCL.....	24
2.3.	Cas particulier des DLBCL avec réarrangement de MYC, double hit, triple hit	26
2.3.1.	Définition	26
2.3.2.	Epidémiologie	27
2.3.3.	Clinique	28
2.3.4.	Morphologie et IHC	29

2.3.5.	Immunophénotypage	32
2.3.6.	Cytogénétique.....	33
2.3.7.	Facteurs pronostiques	34
2.4.	DLBCL avec amplification et hyperexpression de MYC	39
2.4.1.	Amplification de <i>MYC</i>	39
2.4.2.	Hyperexpression de <i>c-myc</i>	40
3.	Objectifs de l'étude	44
4.	Patients, matériel et méthodes	46
4.1.	Sélection des patients	47
4.2.	Recueil des données cliniques et biologiques	48
4.3.	Anatomopathologie	48
4.4.	Analyses de cytogénétique	48
4.5.	Cytométrie en flux.....	50
4.6.	Analyse statistique.....	50
5.	Résultats	52
5.1.	Patients	53
5.2.	Données cliniques	53
5.3.	Anatomopathologie	64
5.4.	Cytogénétique.....	66
5.5.	Immunophénotypage	77
6.	Discussion	80
7.	Conclusion.....	85
	Références bibliographiques	87
	Annexes	94

Liste des abréviations

ABC : Activated B-Cell
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
BCLU : B Cell Lymphoma Unclassifiable
BCR : Récepteur du lymphocyte B
BL : Lymphome de Burkitt
BOM : Biopsie Ostéo-Médullaire
CD : Cluster de Différenciation
CD19/20dim : CD19/20 diminué
CEP8 : Centromère de chromosome 8
CMF : Cytométrie en Flux
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
DH : Double Hit
DLBCL : Lymphome Diffus à Grandes Cellules B
DP : DLBCL double positifs pour l'expression de c-myc et BCL2
EBV : Virus Epstein-Barr
FISH : Fluorescence In Situ par Hybridation
GC : Germinal Center
G-CSF : Granulocyte - Colony Stimulating Factor
HIV : Virus de l'Immunodéficience Humaine
Ig : Immunoglobulines
IgH : Chaîne lourde des immunoglobulines
IgK : Chaîne légère kappa des immunoglobulines
IgL : Chaîne légère lambda des immunoglobulines
IHC : Immunohistochimie
IPI : Index Pronostique International
IPIa : IPI ajusté à l'âge
IPI-R : IPI révisé
LDH : Lactate Déshydrogénase
LEG : Localisations extra-ganglionnaires

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LNH : Lymphome non Hodgkinien

MFI : Intensité Moyenne de Fluorescence

MYCR : *MYC* réarrangé

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

NOS : Not Otherwise Specified

P : p-value

PMBL : Primary Mediastinal B-cell Lymphoma

PS : Performans Status

RFI : Intensité Relative de Fluorescence

SH : Simple Hit

sIg : Immunoglobulines de surface

TH : Triple Hit

Liste des tableaux et figures

Tableaux

Tableau 1: Sous-types de DLBCL NOS selon la classification OMS 2008	8
Tableau 2 : Echelle de détermination du PS.....	14
Tableau 3 : Classification d'Ann Arbor.....	14
Tableau 4 : Index Pronostique International des LNH agressifs.....	15
Tableau 5 : Index Pronostique International ajusté à l'âge des LNH agressifs	16
Tableau 6 : Détermination du groupe de risque selon l'IPI révisé	16
Tableau 7 : Fréquence des réarrangements de <i>MYC</i> dans les DLBCL	19
Tableau 8 : Fréquence des DH / TH dans la littérature	27
Tableau 9 : Incidence des réarrangements et de l'hyperexpression des gènes <i>MYC</i> , <i>BCL2</i> et <i>BCL6</i>	42

Figures

Figure 1 : Lymphopoïèse B dépendante de l'antigène dans le follicule secondaire.....	5
Figure 2 : Classification des DLBCL selon l'algorithme de Hans	10
Figure 3 : Cellules de DLBCL	11
Figure 4 : Survie globale selon la valeur de l'IPI	15
Figure 5 : Survie globale selon l'IPI et selon l'IPI-R.....	16
Figure 6 : Survie globale en fonction du phénotype GC ou non-GC des DLBCL	17
Figure 7 : Partenaires de translocation de <i>MYC</i>	19
Figure 8 : Impact d'un réarrangement de <i>MYC</i> sur la survie globale	20
Figure 9 : Partenaires de translocation de <i>BCL2</i>	22
Figure 10 : Partenaires de translocation de <i>BCL6</i>	23
Figure 11 : Survie sans progression et survie globale en fonction de la présence ou non d'un réarrangement de <i>MYC</i>	29
Figure 12 : Survie globale en fonction du type de DLBCL et des translocations présentes	29
Figure 13 : Cellules de type Burkitt	30
Figure 14 : Survie globale selon l'IPI et le statut de <i>MYC</i>	35
Figure 15 : Survie globale des DLBCL selon l'IPI et la présence de DH	35

Figure 16 : Survie globale en fonction de l'expression de BCL2 avec ou sans t(14;18).....	36
Figure 17 : Immunomarquage par l'anti-MYC.....	40
Figure 18 : Survie globale des DLBCL DP comparée aux non DP, des DLBCL exprimant uniquement c-myc comparée aux doubles négatifs et des DLBCL exprimant BCL2 uniquement comparée aux doubles négatifs.	43
Figure 19 : Survie globale des DLBCL ABC et GC, des DLBCL ABC et GC doubles négatifs et des DLBCL ABC et GC DP.	43
Figure 20 : Survie globale en fonction du risque calculé par l'IPI et l'IPIa.....	55
Figure 21 : Survie globale en fonction du PS et en fonction du nombre de localisations extra-ganglionnaires	55
Figure 22 : Survie globale en fonction de l'envahissement médullaire et en fonction de l'envahissement méningé.....	56
Figure 23 : Survie globale en fonction de la présence ou non d'un envahissement médullaire pour un IPI identique.....	56
Figure 24 : Survie globale selon l'âge	57
Figure 25 : Comparaison de l'incidence en fonction de l'âge : envahissement médullaire, envahissement méningé, localisations extra-ganglionnaires et PS.....	58
Figure 26 : Répartition des IPI et IPIa en fonction de l'âge	58
Figure 27 : Répartition du type de traitement standard versus intensif et avec ou sans rituximab selon l'âge.....	59
Figure 28 : Comparaison de la survie globale avec et sans rituximab	59
Figure 29 : Comparaison de la survie globale en fonction du type de traitement dans la cohorte entière et chez les patients de plus de 65 ans.....	60
Figure 30 : Comparaison patients greffés versus non greffés chez les moins de 65 ans et comparaison de la survie des patients non greffés selon leur âge	61
Figure 31 : Survie globale en fonction du type de greffe de CSH	62
Figure 32 : Impact de la greffe associée à un traitement standard	62
Figure 33 : Impact de la greffe associée à un traitement intensif.....	63
Figure 34 : Impact de l'expression de BCL2 sur la survie	65
Figure 35 : Exemples de configuration pour des sondes break-apart.	66
Figure 36 : Marquage CEP8-IgH	68
Figure 37 : Distribution des âges selon le profil MYCR SH versus DH/TH et selon le profil MYCR détaillé	70
Figure 38 : Survie selon le profil MYCR SH vs DH/TH et selon le profil MYCR détaillé	70
Figure 39 : Survie en fonction du profil MYCR pour des groupes de traitement homogènes .	71
Figure 40 : Survie des patients greffés en fonction de leur profil MYCR.	71
Figure 41 : Caractéristiques cliniques selon le profil MYCR	72

Figure 42 : IPIa selon le profil <i>MYCR</i>	73
Figure 43 : Proportions de chaque type de translocation selon l'âge	73
Figure 44 : Survie globale en fonction du gène partenaire de <i>MYC</i>	74
Figure 45 : Partenaire de <i>MYC</i> en fonction du profil SH, DH ou TH.....	75
Figure 46 : Expression de <i>BCL2</i> en fonction de la présence ou non d'un réarrangement de son gène et survie globale en fonction l'expression de <i>BCL2</i> sans réarrangement	75
Figure 47 : Répartition des RFI de CD20 et de CD79b en fonction du profil <i>MYCR</i>	78
Figure 48 : Interprétation des sIg en CMF en fonction du profil <i>MYCR</i>	79

1. Introduction

1. Introduction

Ces dernières années ont vu naître un intérêt grandissant pour les lymphomes de mauvais pronostic que sont les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL pour Diffuse Large B-Cell Lymphoma) porteurs d'un réarrangement du gène *MYC*. Bien que de plus en plus souvent diagnostiquée, cette pathologie n'appartenant pas à une réelle entité clinique reste encore mal connue et les approches de prise en charge thérapeutiques mal définies.

Ce travail s'inscrit dans la continuité de la publication nantaise de S. Le Gouill et al. en 2007 portant sur une cohorte de patients porteurs de la double translocation impliquant les gènes *MYC* et *BCL2* (1). L'agressivité clinique et le mauvais pronostic liés à la présence de ces anomalies génétiques avaient, à l'époque, été clairement démontrés.

Après de brefs rappels sur la physiopathologie des lymphomes et quelques généralités sur les DLBCL, une revue de la bibliographie concernant les DLBCL avec réarrangement de *MYC* sera exposée. Cette pathologie sera ensuite abordée de façon concrète par l'étude des patients diagnostiqués au CHU de Nantes depuis l'année 2000. Il s'agira de déterminer les caractéristiques cliniques, morphologiques, phénotypiques et cytogénétiques des LNH avec réarrangement de *MYC*, d'essayer de mettre en évidence des facteurs prédictifs de survie au sein de ce groupe et de définir la meilleure approche thérapeutique à mettre en œuvre.

2. Généralités

2. Généralités

Les lymphomes sont des proliférations malignes de cellules lymphoïdes B, T ou NK ayant subi un évènement oncogénique à un stade donné de leur différenciation. La conséquence de cet évènement peut être une dérégulation des signaux de prolifération, de signalisation cellulaire ou encore d'apoptose et conduit alors à une expansion cellulaire clonale.

2.1. Physiopathologie des lymphomes

2.1.1. Rappels sur la lymphopoïèse B

Les lymphocytes B sont produits dans la moelle osseuse. C'est dans ce site qu'ils acquièrent les antigènes de différenciation (CD : Cluster de Différenciation) signant leur engagement dans la lignée B. Une série d'étapes contrôlées accompagne ensuite la recombinaison des gènes des immunoglobulines (Ig) jusqu'à la production de séquences VDJ pour les chaînes lourdes et VJ pour les chaînes légères permettant la production de molécules fonctionnelles. Les lymphocytes B matures naïfs coexpriment des séquences variables sur les chaînes mu (μ) et delta (δ) et ont subi une sélection permettant d'éliminer les cellules auto-réactives.

A leur sortie de la moelle osseuse, les lymphocytes B naïfs migrent par voie sanguine vers les organes lymphoïdes secondaires, lieux de rencontre avec les antigènes du non-soi. Leur association avec les cellules folliculaires dendritiques permet la formation des follicules primaires. En présence d'une réaction immunitaire à un antigène, un centre germinatif (GC pour Germinal Center) apparaît dans un follicule dit secondaire (figure 1). Le mécanisme d'hypermutation somatique (ayant pour but de moduler l'affinité pour l'antigène) débute dans la zone sombre, de forte densité cellulaire, du centre germinatif. A ce stade, les lymphocytes B naïfs subissent une prolifération intense et ne secrètent plus d'Ig : ils sont appelés centroblastes. Puis, dans la zone claire, les centrocytes subissent une sélection, grâce aux cellules folliculaires dendritiques, selon leur affinité pour l'antigène. La zone dite du manteau comporte à la fois des cellules B matures naïves et des centrocytes. Les centrocytes ayant

capté l'antigène le présentent aux lymphocytes T helper folliculaires qui vont, en retour, envoyer des signaux de survie et de différenciation aux lymphocytes B. Ces derniers peuvent alors subir le phénomène de commutation de classe et devenir des immunoblastes puis des cellules B mémoires ou des plasmocytes après passage de la zone du manteau et de la zone marginale (2).

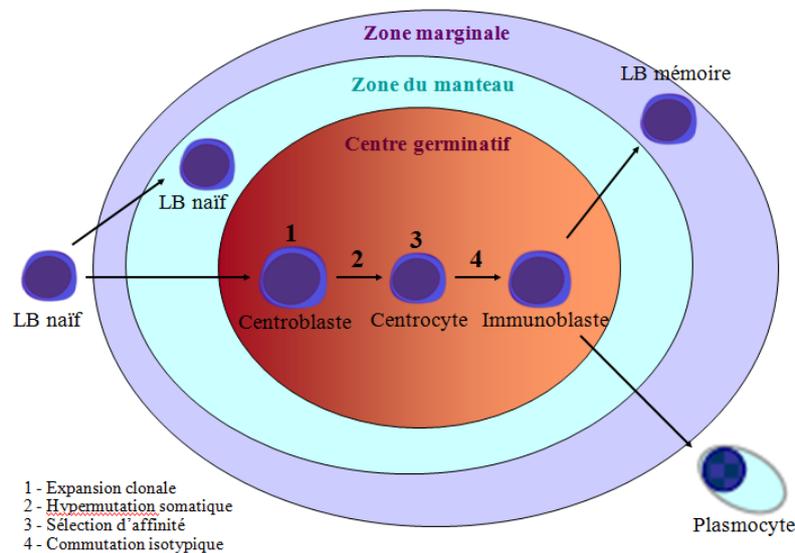


Figure 1 : Lymphopoïèse B dépendante de l'antigène dans le follicule secondaire

Grâce à ces différentes modifications au cours de la lymphopoïèse, il est possible de différencier les lymphocytes selon leur stade de maturation et notamment selon leur passage ou non dans le centre germinatif du ganglion. On distingue donc les cellules pré-GC dont les gènes des Ig sont recombinés mais non mutés, les cellules GC et post-GC dont les gènes des Ig sont à la fois recombinés et mutés.

Chacune des étapes de la lymphopoïèse pouvant être la cible d'un événement oncogénique, à chaque type de lymphome correspond une contrepartie cellulaire normale, base de la classification anatomo-pathologique.

2.1.2. Facteurs de risque des lymphomes

Il n'existe pas de cause unique au développement d'un lymphome mais au contraire, l'apparition d'un évènement oncogénique responsable de la dérégulation du cycle cellulaire est multifactorielle. Plusieurs facteurs de risque sont aujourd'hui reconnus :

- L'immunodépression sous-jacente

Elle peut être liée au virus HIV (Virus de l'Immunodéficience Humaine) ou à un autre déficit immunitaire congénital ou acquis.

- Les maladies auto-immunes

En réponse à un auto-antigène, elles engendrent une réaction immunitaire chronique, d'abord polyclonale puis parfois monoclonale par excès de prolifération ou défaut d'apoptose.

- Les infections virales

Différents mécanismes sont aujourd'hui connus. Il existe notamment des oncoprotéines virales favorisant l'apparition de cancers ou de lymphomes ou encore l'induction par le virus d'une prolifération polyclonale réactionnelle favorisant secondairement l'émergence d'un clone tumoral.

Exemple du Virus Epstein-Barr (EBV)

Les lymphocytes B expriment à leur surface le récepteur à l'EBV (CD21), permettant l'internalisation du virus. L'EBV peut secondairement exprimer des protéines de latence telles que LMP1, induisant un signal d'activation, de prolifération et d'immortalité pour les cellules B infectées. Ce phénomène, normalement contrôlé par les lymphocytes T, peut dans un contexte d'immunodépression conduire à une prolifération monoclonale maligne (3).

- L'exposition à des carcinogènes (solvants, pesticides...)

- La prédisposition génétique familiale

2.2. Les lymphomes B diffus à grandes cellules

2.2.1. Définition

Les DLBCL sont des lymphomes agressifs liés à la prolifération de grandes cellules B transformées. Ils constituent les lymphomes les plus fréquents de l'adulte et forment une entité très hétérogène sur les plans clinique, morphologique, phénotypique et moléculaire.

2.2.2. Epidémiologie

Les DLBCL constituent la variété la plus fréquente de lymphomes, représentant 30 à 40% des lymphomes non Hodgkiniens (LNH) de l'adulte et plus de 80% des lymphomes agressifs (4)(5). L'incidence est estimée à 7,9 cas pour 100 000 habitants par an (5).

L'âge moyen au diagnostic se situe entre 60 et 70 ans, mais il est possible de rencontrer cette pathologie chez des enfants ou des adultes jeunes. Il existe une légère prédominance masculine (Sex Ratio : 1,3 / 1).

Cette pathologie peut apparaître soit de novo, c'est à dire sans antécédent connu de lymphome, soit de façon secondaire, c'est à dire au décours de l'évolution d'une pathologie lymphoïde de bas grade préexistante comme une leucémie lymphoïde chronique (LLC), un lymphome folliculaire, un lymphome lymphoplasmocytaire ou encore un lymphome de la zone marginale (6).

2.2.3. Diagnostic clinique

Les DLBCL sont le plus souvent des pathologies agressives. Les symptômes révélateurs peuvent être l'apparition d'une ou plusieurs adénopathies, une fièvre prolongée, des sueurs nocturnes ou encore une altération de l'état général avec amaigrissement, asthénie, anorexie. La présence de fièvre, de sueurs nocturnes et d'un amaigrissement, classiquement appelés "symptômes B" est de mauvais pronostic. En dehors de ces troubles, le tableau clinique est souvent dominé par une masse tumorale de croissance rapide générant parfois une

symptomatologie en rapport avec le site impliqué, par exemple, une adénopathie médiastinale volumineuse responsable de douleurs thoraciques ou de toux. Cette masse peut être localisée ou au contraire concerner plusieurs territoires ganglionnaires ou extra-ganglionnaires. Dans plus de 40% des cas, il n'existe pas d'atteinte ganglionnaire au diagnostic (6). Les organes les plus souvent impliqués sont le tube digestif, les os, les aires lymphoïdes de la sphère oropharyngée (amygdales, glandes salivaires), les organes génitaux, la rate, le foie, la thyroïde, les reins ou encore les surrénales. L'extension de ces lymphomes se fait à la fois par voie lymphatique et hématogène.

2.2.4. Classification anatomo-pathologique

La classification des lymphomes repose sur l'analyse anatomo-pathologique d'une biopsie ganglionnaire ou tissulaire.

Sur le plan histopathologique, les DLBCL ont en commun une perte de l'architecture tissulaire normale et une répartition diffuse de la population tumorale constituée de grandes cellules lymphoïdes matures de type B. Il existe, au sein de ce groupe hétérogène incluant pas moins de 15 sous-types différents, des entités anatomocliniques bien définies et individualisées dans la classification OMS 2008, comme les formes cutanées ou médiastinales. Une fois ces entités éliminées, le pathologiste se retrouve face au groupe très hétérogène des DLBCL dits « NOS » (pour Not Otherwise Specified) au sein duquel il devra essayer de préciser le sous-type morphologique, immunohistochimique et moléculaire (tableau 1) (6).

Variants morphologiques communs	Centroblastique Immunoblastique Anaplasique
Sous-groupes moléculaires	Type cellule B du centre germinatif (GC) Type cellule B activée (ABC)
Sous-groupes immunohistochimiques	DLBCL CD5+ Type GC Type non-GC

Tableau 1: Sous-types de DLBCL NOS selon la classification OMS 2008

L'étude morphologique permet d'identifier 3 groupes récurrents de DLBCL : centroblastique, immunoblastique et anaplasique.

Le variant centroblastique est le plus fréquent, il est constitué de cellules de taille moyenne à grande, à cytoplasme basophile et réduit et dont le noyau à chromatine fine comporte 2 à 4 nucléoles.

Le variant immunoblastique est caractérisé par des cellules au cytoplasme plus étendu comportant un noyau central. Une différenciation plasmocytaire peut être observée.

Enfin, le variant anaplasique est défini par des cellules plus grandes, rondes ou polygonales, dont le noyau peut avoir différentes formes pouvant évoquer des cellules de Sternberg, des cellules de lymphome T anaplasique ou encore des métastases de cancers non hématologiques.

La confirmation de la nature lymphocytaire B des DLBCL repose sur des techniques d'immunohistochimie (IHC), complémentaires de l'analyse morphologique. Elle peut aussi impliquer une étude en cytométrie en flux (CMF) sur des cellules dilacérées de biopsie fraîche.

En IHC, l'orientation diagnostique devant des cellules d'allure lymphomateuse se fait donc en premier lieu par utilisation d'anticorps ciblant les antigènes pan-B (généralement CD19, CD20, CD22 et CD79a) et pan-T (CD3) (7). CD79 est une molécule de transduction du signal associée au récepteur du lymphocyte B (BCR pour B-Cell Receptor) qui est exprimée à tous les stades cellulaires B jusqu'au lymphocyte B mémoire. CD19 et CD22, molécules stabilisatrices du BCR, marquent également les cellules dès leur engagement dans la lignée B jusqu'au stade plasmocyte. CD20, qui est impliqué dans l'activation des lymphocytes B, marque toutes les cellules B matures hormis les plasmocytes.

L'index de prolifération cellulaire est chiffré grâce à l'utilisation d'un anticorps (MiB1) ciblant une protéine nucléaire des cellules en mitose (Ki67).

CD5, marqueur plutôt associé aux lymphocytes T et à une faible proportion des cellules B circulantes normales, est également testé devant une prolifération à grandes cellules possiblement de type lymphome du manteau (CD5⁺).

L'étude du profil d'expression génique (transcriptome) a conduit à l'instauration d'une nouvelle classification distinguant les DLBCL de type centre germinatif (GC pour Germinal Center) et les DLBCL de type lymphocyte B activé (ABC pour Activated B-Cell).

L'étude du transcriptome n'étant pas réalisable en routine, des algorithmes ont été proposés afin d'approcher le type GC ou ABC en utilisant l'IHC. Bien qu'imparfaite, la combinaison d'un panel de marqueurs permet généralement de distinguer les DLBCL exprimant l'antigène CD5, les DLBCL de type centrofolliculaire (GC) et les DLBCL non centrofolliculaires (non-GC et par extension ABC).

Pour cela, l'algorithme communément utilisé est l'algorithme de Hans (figure 2) qui associe un profil CD10⁺, BCL6⁺, IRF4/MUM1⁻ au type GC et un profil CD10⁻, BCL6^{+/-}, IRF4/MUM1⁺ au type non-GC (8). La corrélation entre les deux techniques confirme que le type GC possède un phénotype proche des cellules B du centre germinatif. Quant au type ABC, il est proche des lymphocytes B activés et exprime également BCL2 et la cycline D2.

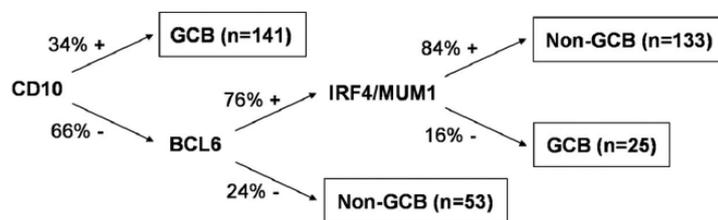


Figure 2 : Classification des DLBCL selon l'algorithme de Hans (8)

Dans environ la moitié des cas, une coexpression de BCL6 et d'IRF4/MUM1 est retrouvée, alors que ces marqueurs s'excluent mutuellement dans les lymphocytes B normaux.

Bien que les DLBCL de type ABC aient le plus souvent une morphologie immunoblastique et que ceux de type GC aient plutôt une morphologie de type centroblastique, la classification basée sur l'IHC n'est pas superposable à la classification morphologique et la différenciation entre GC et ABC ne peut pas se faire sur la morphologie des cellules (9).

Ki67 est toujours élevé, très souvent supérieur à 40% et parfois supérieur à 90%. On parle de pathologie hautement proliférante au delà d'un seuil de 80%. L'impact pronostic de ce marqueur est discuté (6).

2.2.5. Cytologie et immunophénotypage

En cytologie, les cellules lymphomateuses de DLBCL ont un aspect variable mais il s'agit le plus souvent de cellules d'allure blastique de grande taille, au cytoplasme basophile parfois vacuolé, présentant fréquemment un nucléole et une chromatine décondensée (figure 3).

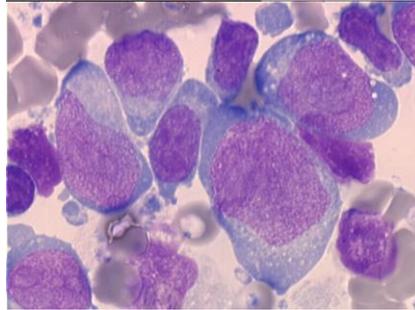


Figure 3 : Cellules de DLBCL (Photographie : R. Garand)

L'immunophénotypage retrouve une population de cellules souvent de grande taille et matures exprimant fortement CD45 et dépourvues de CD34. Ces cellules expriment généralement les antigènes pan-B : CD19, CD20, CD22 et CD79a, ainsi que, dans plus de la moitié des cas, des Ig de surface (sIg) ou intracytoplasmiques. Certains marqueurs seraient plus spécifiques d'un variant comme CD30, positif uniquement dans les formes anaplasiques. CD5 n'est exprimé que dans 10% des cas de DLBCL (6).

Comme mentionné plus haut, cet immunophénotype en CMF peut être effectué sur des cellules éluées de biopsie ganglionnaire, de cytoponction, ou, lorsqu'elles sont présentes, sur des cellules lymphomateuses circulantes.

2.2.6. Cytogénétique

Les principaux évènements oncogéniques aboutissant à la transformation en lymphome sont des translocations chromosomiques, des délétions et des mutations ponctuelles. Ces anomalies sont détectables en cytogénétique et influent généralement sur le pronostic de la pathologie.

Dans le cadre particulier des DLBCL, les oncogènes communément dérégulés qui font l'objet de recherches spécifiques en cytogénétique sont notamment : *MYC*, *BCL2* et *BCL6*.

Différents types de translocation chromosomiques existent, conduisant soit à la création d'un gène chimérique (exemple de la t(9;22) à l'origine de la protéine kinase BCR-ABL), soit à la dérégulation d'un des gènes impliqués dans le réarrangement (exemple de *MYC* dans la t(8;14)) (10). Des gains et des pertes de matériel chromosomique sont également observés et conduisent à la surexpression de protéines, à des gains ou à des pertes de fonctions.

Le caryotype tumoral, permettant de définir une formule cytogénétique, s'effectue sur des prélèvements frais. Cette technique nécessite une mise en culture des cellules afin d'obtenir des chromosomes en métaphase, étape du cycle cellulaire pendant laquelle ils sont observables.

La Fluorescence In Situ par Hybridation (FISH) est basée sur l'utilisation de fragments d'ADN synthétiques marqués par des fluorochromes, appelés sondes, ayant la capacité de s'hybrider avec leur cible complémentaire dans le noyau de la cellule examinée.

Le marquage peut s'effectuer quel que soit le stade du cycle cellulaire et cette technique possède donc l'avantage d'être praticable non seulement sur des tissus frais, mis en culture ou non, mais également sur des prélèvements tumoraux conservés selon différentes techniques : appositions sur lame, inclusions en paraffine ou encore prélèvements congelés.

L'inconvénient de la FISH est son manque d'exhaustivité car elle nécessite un choix restreint de sondes testées et seuls quelques gènes ciblés sont étudiés en fonction du contexte clinique. De plus, les analyses de FISH peuvent être faussement négatives en présence de translocations variantes pour lesquelles les points de cassure sont centromériques ou télomériques par rapport à la sonde commerciale utilisée (11).

Différents types de sondes peuvent être utilisés :

- Les sondes locus spécifiques

Elles permettent de mettre en évidence un ou plusieurs gènes particuliers. Il en existe plusieurs variants tels que les sondes de fusion ou les sondes de séparation ("break-apart"). Les sondes de fusion correspondent à deux loci marqués avec deux

fluorochromes différents permettant de mettre en évidence un réarrangement entre ces deux loci. Les sondes "break-apart" sont composées de deux sondes avec deux fluorochromes différents encadrant le point de cassure d'un gène. Ces sondes sont colocalisées à l'état normal et séparées lorsque le gène est réarrangé.

- Les sondes de type peinture

Elles marquent soit l'intégralité d'un chromosome, soit seulement un bras court ou un bras long.

- Les sondes centromériques

Elles marquent le centromère d'un chromosome particulier.

- Les sondes subtélomériques

Elles marquent l'extrémité d'un chromosome particulier.

2.2.7. Bilan d'extension

Le bilan d'extension est indispensable pour déterminer les facteurs pronostiques de la maladie, évaluer la dissémination du lymphome et son agressivité, ainsi que l'état clinique du patient avant de débiter le traitement.

Ce bilan comporte un hémogramme, des examens d'imagerie (radiographies, scanner thoraco-abdomino-pelvien...), une biopsie ostéo-médullaire (BOM) et une ponction lombaire.

La prolifération tumorale, reflet de l'agressivité du lymphome, est estimée par le dosage des taux de Lactate Déshydrogénase (LDH), de bêta-2-microglobuline et par la recherche d'un syndrome inflammatoire (Protéine C réactive, fibrinogène).

Les conséquences du syndrome tumoral sont évaluées par un hémogramme permettant d'évaluer la fonction médullaire, un bilan hépatique et un bilan biochimique à la recherche d'un syndrome de lyse tumorale.

Une composante auto-immunitaire pouvant être présente, une électrophorèse des protéines sériques à la recherche d'un composant monoclonal et un test de Coombs recherchant des auto-anticorps dirigés contre les hématies sont également effectués.

Des sérologies virales (EBV, HIV, hépatites B et C...) sont réalisées à la fois dans un but de recherche étiologique et dans le cadre du bilan pré-transfusionnel.

Enfin, un bilan pré-thérapeutique est indispensable pour évaluer les fonctions rénale et cardiaque du malade ainsi que pour éliminer la présence d'un foyer infectieux.

Il est indispensable de chiffrer l'état général du patient au diagnostic afin d'estimer le retentissement de sa maladie et d'appréhender sa tolérance à la chimiothérapie. Cette estimation de l'état général, appelée Performans Status (PS), est définie par un chiffre allant de 0 à 4 selon une échelle d'activité (tableau 2) (12).

PS	Activité du patient
0	Asymptomatique
1	Symptomatique mais activité normale
2	Alitement < 50% de la journée
3	Alitement > 50% de la journée
4	Alitement permanent

Tableau 2 : Echelle de détermination du PS

2.2.8. Facteurs pronostiques

➤ Facteurs pronostiques cliniques

Au terme du bilan d'extension, la première façon d'estimer le risque des patients atteints de lymphomes est d'utiliser la classification d'Ann Arbor, dont les critères sont listés dans le tableau 3 (12). Il est estimé qu'environ la moitié des patients sont diagnostiqués au stade I ou II.

Stade	Territoires envahis
I	Un seul territoire ganglionnaire
II	Au moins 2 territoires ganglionnaires du même côté du diaphragme
III	Atteinte ganglionnaire sus et sous diaphragmatique
IV	Atteinte viscérale ou médullaire

Tableau 3 : Classification d'Ann Arbor

Cette classification d'Ann Arbor basée uniquement sur l'envahissement des territoires est très insuffisante. Ainsi, afin d'adapter au mieux la prise en charge et d'uniformiser les pratiques, des scores se voulant prédictifs du devenir des patients et intégrant notamment des données cliniques et biologiques ont été créés pour chaque famille de lymphomes : LNH agressifs, LNH indolents et lymphomes de Hodgkin. Pour les patients atteints de LNH agressif, il s'agit de l'Index Pronostique International (IPI).

Pour calculer l'IPI, 5 critères sont pris en compte. Il s'agit de l'âge, du stade clinique selon Ann Arbor, du PS, du taux de LDH et du nombre de sites extra-ganglionnaires atteints. Un point est attribué pour chacun des critères suivants (12) :

- Age supérieur à 60 ans
- Stade clinique égal à III ou IV (dissémination du lymphome)
- PS supérieur à 2
- Taux de LDH supérieur à la normale
- Atteinte de 2 sites extra-ganglionnaires ou plus.

L'IPI se situe alors entre 1 et 5, ce qui permet de classer les patients en plusieurs groupes prédictifs de survie (tableau 4, figure 4) (12).

Groupe de risque	IPI	Survie globale à 5 ans
Faible	0 ou 1	73 %
Intermédiaire faible	2	51 %
Intermédiaire haut	3	43 %
Haut	4 ou 5	26 %

Tableau 4 : Index Pronostique International des LNH agressifs

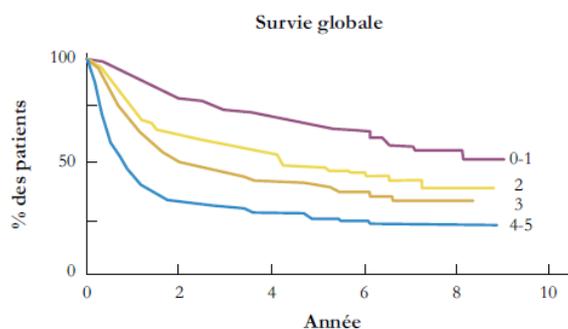


Figure 4 : Survie globale selon la valeur de l'IPI (12)

Pour les patients âgés de moins de 60 ans, un IPI ajusté à l'âge (IPIa) est calculé sur 3 points uniquement en fonction du PS, du taux de LDH et du stade clinique (tableau 5) (12).

Groupe de risque	IPIa	Survie globale à 5 ans
Faible	0	83 %
Intermédiaire faible	1	69%
Intermédiaire haut	2	46 %
Haut	3	32 %

Tableau 5 : Index Pronostic International ajusté à l'âge des LNH agressifs

Depuis l'utilisation du rituximab (anticorps monoclonal chimérique anti-CD20), il est parfois observé une perte de la valeur prédictive de l'IPI pour le devenir des patients (13). Les courbes de survie en fonction de l'IPI ne séparent plus les patients en 4 groupes mais seulement en 2 groupes regroupant pour l'un les patients de risque faible et intermédiaire faible et pour l'autre ceux de risque intermédiaire haut et haut (figure 5A). Il a donc été proposé un IPI révisé (IPI-R) séparant les patients différemment selon leur nombre de facteurs de risque (tableau 6) (13). Ce score sépare les patients en 3 groupes de risque bien distincts (figure 5B).

IPI révisé	Nombre de facteurs de risque	Survie globale à 4 ans
Très bon pronostic	0	94%
Bon pronostic	1,2	79%
Mauvais pronostic	3, 4, 5	55%

Tableau 6 : Détermination du groupe de risque selon l'IPI révisé

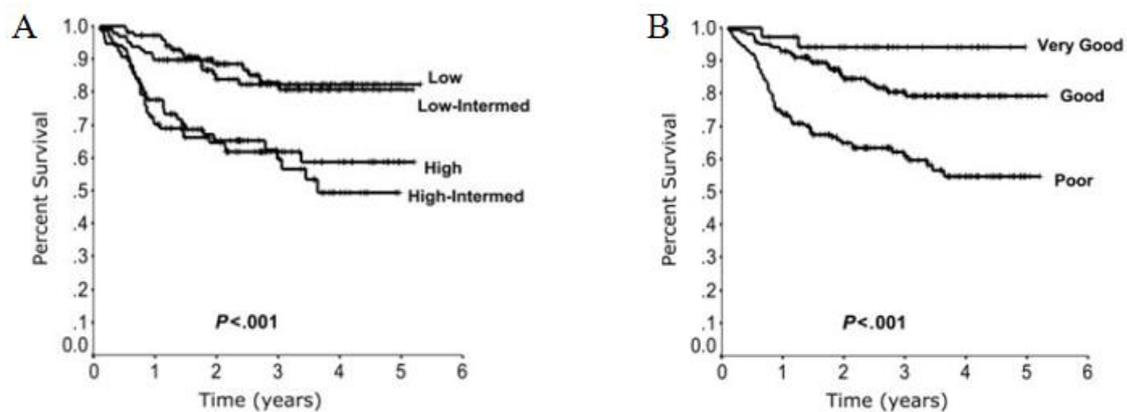


Figure 5 : Survie globale selon l'IPI (A) et selon l'IPI-R (B) (13)

D'autres facteurs pronostiques cliniques ont été publiés plus récemment (12). Le diamètre de la lésion tumorale chez les patients jeunes pourrait impacter le pronostic. De même, les patients de sexe masculin auraient une perte de chance à cause d'une clairance plus élevée du rituximab (13). L'élévation des chaînes légères sériques, reflet du syndrome tumoral, serait également péjorative. Enfin, pour un IPI égal, l'envahissement médullaire serait un facteur pronostic défavorable.

➤ **Facteurs pronostiques liés au phénotype**

Les DLBCL de phénotype GC semblent avoir un meilleur pronostic que ceux ayant un phénotype ABC, indépendamment de l'IPI (figure 6) (14). Le type ABC est aujourd'hui connu pour être associé à une activation constitutive de la voie de signalisation NF-κB favorisant la survie cellulaire par induction de la prolifération et inhibition de l'apoptose (15). Les gènes activés dans ce contexte sont, en autres, *MYC*, *BCL2*, *MUM1* ou encore le gène de la cycline D2. En accord avec ce mauvais pronostic associé au type ABC, une valeur pronostique péjorative a été retrouvée associée à la morphologie immunoblastique (9).

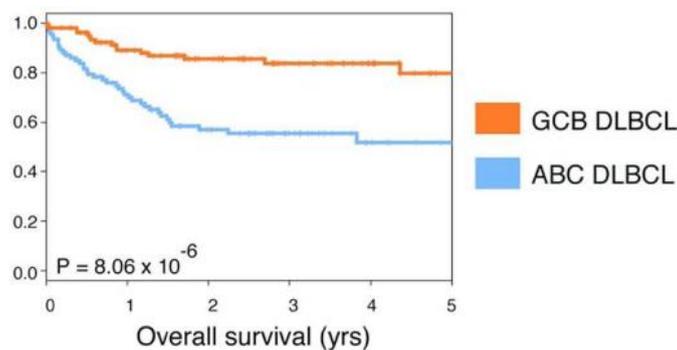


Figure 6 : Survie globale en fonction du phénotype GC ou non-GC des DLBCL (14)

Cette différence a été également décrite dans une série de DLBCL réfractaires ou en rechute pour lesquels les taux de rémission complète étaient de 49% pour le type GC contre 31% pour le type non-GC (16). Malgré une amélioration du pronostic dans les 2 groupes depuis l'utilisation du rituximab, il persiste une différence entre GC et ABC au détriment des DLBCL de type ABC (14)(17)(18).

La recherche de biomarqueurs, en plus du score pronostic que représente l'IPI, a mis en évidence un effet défavorable de la surexpression de BCL2 et un impact pronostic favorable de l'expression de BCL6 chez les patients traités par chimiothérapie seule (19). Ces facteurs pronostiques ne seraient pas retrouvés chez les patients recevant du rituximab (12). D'après Sehn et al., le rôle défavorable de l'hyperexpression de BCL2 semble ne plus exister aujourd'hui que dans le type GC et la positivité de CD5 et de Ki67 serait également prédictive du devenir pour un IPI similaire (13).

➤ **Facteurs pronostiques liés à la cytogénétique**

- **Anomalies du gène *MYC***

Situé sur le chromosome 8 au niveau du locus 8q24, le gène *MYC* code pour un proto-oncogène, la protéine c-myc, qui est un régulateur positif de la prolifération cellulaire. Pour se fixer à l'ADN et être actif, c-myc doit subir une hétérodimérisation avec son partenaire max. Ce facteur de transcription est impliqué dans de nombreuses fonctions, notamment la transition G0-G1 du cycle cellulaire, la différenciation, la synthèse protéique ou encore la régulation de l'apoptose.

Une diminution de l'expression de c-myc est notamment requise pour que les cellules quittent le cycle cellulaire et se différencient (20). Par sa capacité à manipuler le microenvironnement, c-myc serait également impliqué dans l'angiogénèse des lymphomes et la croissance tumorale (21). Enfin, le facteur de transcription favorise l'apoptose à la fois par libération et stabilisation de protéines pro-apoptotiques (p53, BIM...) ainsi que par répression de protéines anti-apoptotiques (BCLX_L, BCL2...) (22).

L'expression de c-myc est corrélée à la prolifération cellulaire et elle peut être augmentée par réarrangement de son gène, en particulier par translocation avec les gènes des Ig.

La translocation t(8;14) et ses variantes t(2;8) et t(8;22) impliquent *MYC* et les gènes des Ig : chaîne lourde (*IGH*, en 14q32), chaîne légère kappa (*IGK* en 2p11), chaîne légère lambda (*IGL* en 22q11). Elles sont classiquement associées au lymphome de Burkitt (BL pour Burkitt Lymphoma) qui présente un réarrangement de *MYC* dans environ 90% des cas (22)(23) et dans lequel elles ont alors une valeur diagnostique. Les translocations présentes dans ce contexte sont approximativement la t(8;14) dans 80% des cas, la t(2;8) dans 15% des cas et la t(8;22) dans 5% des cas (24). Des images de caryotypes simples avec ces 3 translocations sont insérées en annexe 1.

Il existe d'autres gènes partenaires des translocations de *MYC*, représentés sur la figure 7, le plus fréquent étant PAX5 situé en 9p13 (25).

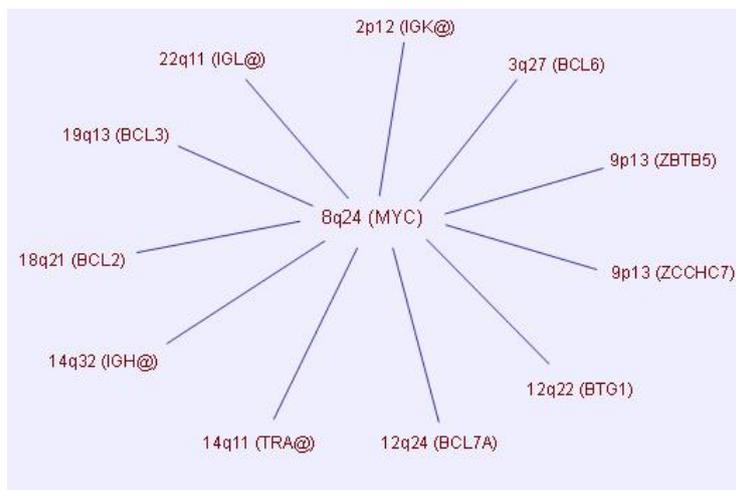


Figure 7 : Partenaires de translocation de *MYC* (Source : atlasgeneticsoncology.org) (26)

Des réarrangements de *MYC* sont aussi retrouvés dans environ 10% des DLBCL (tableau 7), mais également dans d'autres lymphomes (folliculaire, manteau, LLC, lymphome à cellules T ou lymphome plasmablastique), dans le myélome ou encore des leucémies aiguës.

Auteurs	Pourcentage de DLBCL avec réarrangement de <i>MYC</i>
Barrans et al. (27)	14%
Green et al. (28)	11%
Savage et al. (29)	8,8%
Valera et al. (30)	7%
Carbone et al. (31)	6%

Tableau 7 : Fréquence des réarrangements de *MYC* dans les DLBCL

Bien que similaires dans les 2 types de pathologies, les translocations impliquant *MYC* sont aujourd'hui considérées comme un évènement primaire et isolé dans la pathogénie du BL, contrairement aux DLBCL dans lesquels elles seraient plutôt un évènement secondaire survenant sur un terrain lymphomateux préexistant.

Dans ce contexte de DLBCL, les réarrangements de *MYC* sont aujourd'hui connus pour être de mauvais pronostic, indépendamment de l'IPI. En effet, entre autres auteurs, Savage et al. ont décrit en 2009 une survie significativement inférieure et un fort taux de rechutes en présence de réarrangement de *MYC* (survie globale de 33% contre 72% à 5 ans) (29). Dans leur étude publiée en 2010, Barrans et al. ont confirmé cette tendance avec des survies globales de 35% contre 61% à 2 ans (figure 8) (27).

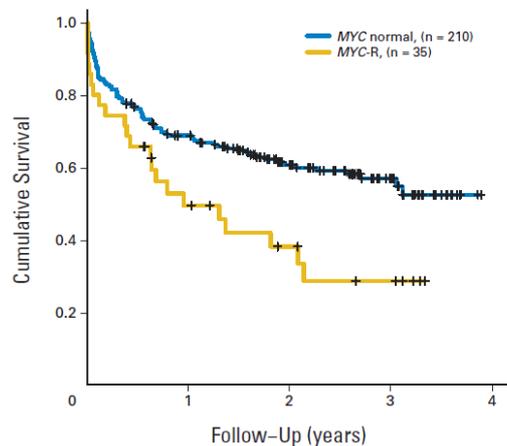


Figure 8 : Impact d'un réarrangement de *MYC* sur la survie globale (27)

Ce mauvais pronostic associé aux réarrangements de *MYC* est également retrouvé dans la série publiée par Cuccuini concernant des DLBCL en rechute ou réfractaires (16). Ces lymphomes ont un taux de réponse inférieur quelle que soit la chimiothérapie mise en œuvre (29% versus 62%) et le seul facteur prédictif de survie significatif était, dans cette étude, la présence d'un réarrangement de *MYC*, indépendamment du type moléculaire GC ou non-GC et du type de traitement. Le statut réarrangé de *MYC* (*MYCR*) semble donc annuler le facteur de bon pronostic conféré par le type GC.

Dans certaines pathologies (maladies hématologiques ou tumeurs solides), il est parfois retrouvé une expression anormalement élevée de la protéine c-myc sans réarrangement de son gène en technique FISH. Cette observation suggère l'existence d'autres mécanismes aboutissant à une activation de *MYC*. Les hypothèses évoquées sont notamment la mutagénèse insertionnelle par intégration dans le gène d'intérêt de séquences d'ADN étrangers tels que des ADN proviraux. Il peut également exister des duplications de gènes, d'autres types de mutations ponctuelles ou encore une influence des micro ARN (32)(19). Ces amplifications de *MYC* sans translocation de son locus, à l'origine d'une prolifération cellulaire intense, seraient également de mauvais pronostic (33).

- **Anomalies du gène *BCL2***

Le gène *BCL2*, situé sur le chromosome 18 au niveau du locus 18q21.33, code pour une protéine anti-apoptotique (*BCL2*), initiant la cascade d'activation des caspases.

La translocation t(14;18), translocation récurrente retrouvée dans 85% des cas de lymphome folliculaire (34), implique les gènes *BCL2* et *IGH*. Elle place *BCL2* sous le contrôle des séquences régulatrices du gène *IGH*, aboutissant à une hyperexpression de *BCL2* et donc à un effet anti-apoptotique non contrôlé pour le clone porteur de la translocation.

Cette t(14;18) est également mise en évidence dans 20 à 30% des cas de DLBCL de novo, préférentiellement dans le type GC, et serait de mauvais pronostic (10)(35). Visco et al. ont rapporté une survie inférieure, équivalente aux DLBCL de type ABC, pour les DLBCL de type GC ayant une t(14;18) isolée (36).

Comme pour *MYC* précédemment, il existe plusieurs partenaires de translocation de *BCL2* (figure 9).

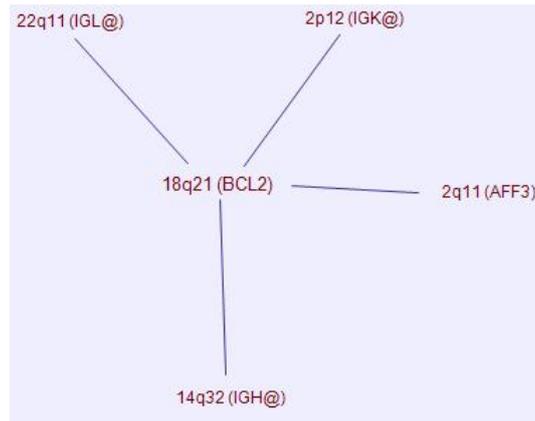


Figure 9 : Partenaires de translocation de *BCL2* (source : atlasgeneticsoncology.org) (26)

- **Anomalies du gène *BCL6***

Le gène *BCL6* est situé sur le chromosome 3 au niveau du locus 3q27. Il code pour le facteur de transcription du même nom, essentiel dans la maturation normale des cellules B par son implication dans la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération, du switch isotypique, de la différenciation ou encore de l'activation cellulaire.

BCL6 agit en inhibant l'activation et la différenciation des cellules B du centre germinatif. D'autre part, par répression de la transcription du gène suppresseur de tumeur *TP53* notamment (37), il module transitoirement l'apoptose et permet une tolérance aux dommages physiologiques de l'ADN, nécessaires aux mécanismes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique (38).

Des réarrangements du gène *BCL6* sont retrouvés dans environ 40% des DLBCL, constituant l'anomalie chromosomique la plus fréquemment rencontrée dans ces pathologies. Ces translocations associent *BCL6* avec un gène des Ig ou avec un autre partenaire (figure 10), provoquant une dérégulation de l'expression de la protéine. L'hyperexpression de *BCL6* produit alors un blocage de la différenciation et allonge la survie des cellules ayant subi un évènement oncogénique, favorisant ainsi l'émergence d'un clone tumoral.

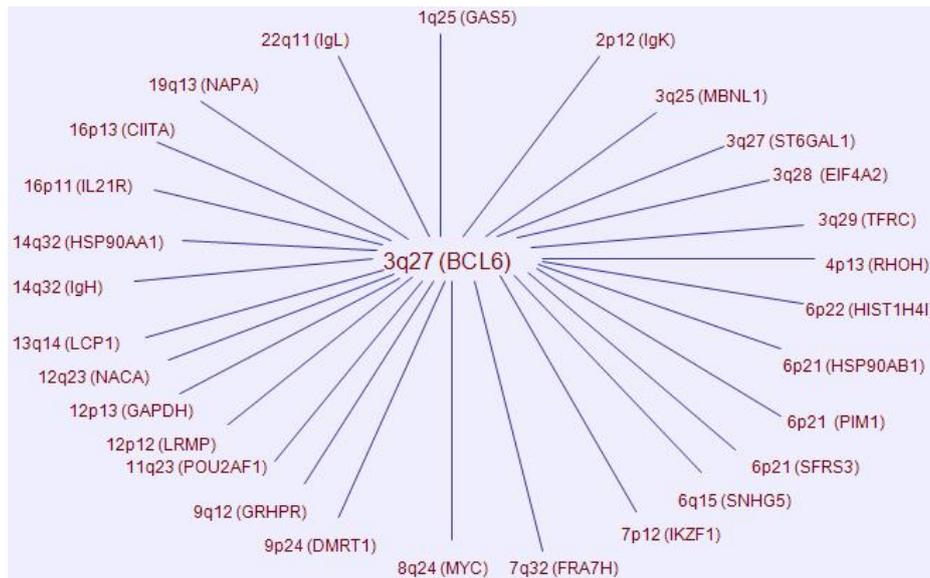


Figure 10 : Partenaires de translocation de *BCL6* (source : atlasgeneticsoncology.org) (26)

Le niveau d'expression de *BCL6* n'est pas corrélé à la présence d'une translocation de son gène (10). En effet, les translocations de *BCL6* sont retrouvées dans 20 à 30% des DLBCL type ABC ou des DLBCL à cellules B primitifs du médiastin (PMBL) et seulement 10% des DLBCL type GC. Au contraire, l'hyperexpression de *BCL6* en IHC est plutôt associée aux DLBCL de type GC. Ceci suggère la possibilité d'une régulation négative de *BCL6* lors d'une translocation et l'existence d'autres mécanismes d'hyperexpression.

L'impact pronostique des translocations de *BCL6* est discuté. Il dépendrait en partie de son gène partenaire et du type GC ou non-GC (17)(39)(40)(41).

- **Autres anomalies génétiques**

De nombreuses autres anomalies chromosomiques non spécifiques sont retrouvées dans les DLBCL. Ainsi on observe des gains en 12q dans le type GC, des gains en 2p et 9p dans le type PMBL ou encore des trisomies 3, des additions en 3q ou 18q ou des délétions en 6q dans le type ABC (4). Les conséquences, en termes de surexpression génique ou non, de ces gains de matériel chromosomique pour un même locus sont variables selon le type GC, ABC ou PMBL des DLBCL. Certaines de ces anomalies sont fréquemment liées à des modifications de l'index de prolifération cellulaire, de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou de la nature de l'environnement cellulaire tissulaire.

Enfin, des mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* sont rapportées dans 20% des DLBCL et sont corrélées à un pronostic péjoratif.

2.2.9. Traitement des DLBCL

Le traitement de référence des DLBCL a longtemps été une polychimiothérapie de type CHOP associant les molécules de Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicine, Oncovin® (vincristine) et Prednisone. Les taux de rémission se situaient entre 50 et 60%, avec une bonne concordance selon l'IPI. Au-delà de 80 ans, les doses sont diminuées et on parle de "mini-CHOP".

L'addition du rituximab et la généralisation du R-CHOP (Rituximab-CHOP) a amélioré de façon considérable le pronostic des patients et l'IPI semble avoir perdu en partie sa valeur prédictive (12).

Chez les patients les plus jeunes (jusqu'à 60 ans environ), des chimiothérapies plus intensives similaires à celles utilisées chez les malades atteints de lymphome agressif peuvent être utilisées (42)(43)(44).

La prophylaxie neuroméningée par injections intrathécales de chimiothérapie est systématique.

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) a aussi sa place dans le traitement des DLBCL, en première ligne pour les patients à IPI intermédiaire haut ou haut, ou en cas de rechute (42)(45).

On peut alors avoir recours à l'autogreffe, processus permettant de recueillir les CSH du malade après un traitement associant chimiothérapie et facteurs de croissance (Granulocyte Colony Stimulating Factor : G-CSF) et de les lui réinjecter après un conditionnement myéloablateur par chimiothérapie et/ou radiothérapie.

Pour les patients les plus jeunes et sans comorbidités pouvant supporter un conditionnement très toxique, l'allogreffe classique peut être indiquée. Il s'agit, après un conditionnement myéloablatif, d'utiliser les CSH d'un donneur (donneur familial, donneur de ficher ou sang de cordon) pour remplacer le système immunitaire du patient afin de lutter

contre les cellules tumorales : effet du greffon contre l'hôte (Graft versus Leukemia : GVL) (42).

Chez les patients en réponse incomplète ou en rechute après autogreffe, chez qui l'âge ou les comorbidités rendraient le conditionnement myéloablatif trop risqué, la mini allogreffe peut être employée. Cette stratégie ne nécessite qu'un conditionnement immunosuppresseur, diminuant les risques liés à une chimiothérapie haute dose (42).

Les principales complications de l'allogreffe sont d'une part infectieuses, liées à l'immunodépression et d'autre part en relation avec la maladie du greffon contre l'hôte (Graft versus Host : GVH). Plus rarement, on observe un rejet du greffon (perte de chimérisme).

2.3. Cas particulier des DLBCL avec réarrangement de MYC, double hit, triple hit

2.3.1. Définition

Comme indiqué plus haut, la proportion de DLBCL présentant un réarrangement de *MYC* est estimée aux alentours de 10%. Contrairement au BL, ces lymphomes sont de mauvais pronostic et présentent très souvent un caryotype complexe associé.

La recherche d'une translocation de *MYC* n'est pas systématique. Elle est déclenchée face à une présentation clinique agressive (PS haut, taux de LDH élevé, envahissement méningé...) ou un envahissement médullaire évocateur. Néanmoins, des études sur des cohortes non sélectionnées de DLBCL ont montré que les lymphomes *MYC* n'ont pas toujours de signes cliniques évocateurs d'un LNH à haut risque, ni d'histologie ou de phénotype typique (29)(46). La proportion de ces lymphomes serait donc sous-estimée.

Parmi ces DLBCL avec réarrangement de *MYC*, on retrouve une proportion non négligeable de cas de DLBCL dits "Double Hit" (DH) ou "Triple Hit" (TH) dans lesquels sont associées une ou deux translocations supplémentaires impliquant *BCL2* et/ou *BCL6*. On oppose à ces DH et TH, les DLBCL "simple hit" (SH) ayant un réarrangement isolé de *MYC*.

Certains auteurs associent également aux DH, les lymphomes associant des réarrangements de *MYC* et de la cycline D1 (*CCND1*) ou encore de *BCL3* (47)(48).

Dans la série de 16 cas de DH publiée en 2007 par l'équipe nantaise de Le Guill et al. (1), comme dans la plupart des autres séries publiées (34)(41)(46)(49)(50)(51)(52)(53)(54)(55), les DH sont caractérisés par une agressivité clinique importante, une morphologie et un phénotype de type GC, un caryotype complexe et un pronostic très sombre.

2.3.2. Epidémiologie

Parmi les 10% de DLBCL avec réarrangement de *MYC*, la proportion de DH et TH est variable selon les études (tableau 8).

Auteurs	Fréquence des DH/TH
Valera et al. (30)	40 à 80% des DLBCL <i>MYCR</i>
Johnson et al. (34)	4% des LNH
Green et al. (28)	6% des DLBCL
Savage et al. (29)	DH <i>BCL2</i> : 25% des DLBCL <i>MYCR</i>
Barrans et al. (27)	83% des DLBCL <i>MYCR</i> de novo

Tableau 8 : Fréquence des DH / TH dans la littérature

La translocation associée est le plus souvent celle de *BCL2* (65%), viennent ensuite les TH (25%) puis les DH avec translocation de *BCL6* (10%) (27). L'équipe de Tomita confirme cette fréquence de TH avec un taux de 26% sur son étude (49).

Les DLBCL *MYCR*, DH et TH sont diagnostiqués principalement chez l'adulte, et leur incidence augmente avec l'âge (6). Malgré cela, par comparaison aux autres DLBCL, à IPI égal, les patients atteints de DLBCL DH sont plus jeunes (64 ans versus 71 ans). Cette moyenne d'âge au diagnostic implique donc des patients plus âgés que les BL (30 ans en moyenne) et plus jeunes que les autres DLBCL (47).

Seuls 15 à 20% des LNH de haut grade DH ont un antécédent connu de lymphome indolent, le plus souvent de type folliculaire (47).

Dans une cohorte non sélectionnée de DLBCL, Pedersen et al. ont déterminé un taux de DH de 21% parmi les DLBCL transformés et de 7% parmi les DLBCL de novo (46). Dans cette cohorte prospective, les patients chez lesquels a été identifiée une double translocation n'avaient pas forcément de présentation clinique agressive ou de morphologie évocatrice conduisant à la recherche de réarrangement de *MYC*. Les DH ne pourraient donc pas tous être identifiés sur des critères cliniques ou morphologiques.

De plus, des anomalies cryptiques des gènes incriminés peuvent ne pas être détectables par les techniques de cytogénétique de routine et conduire à une sous-estimation des cas de

DH/TH. L'association de 2 types de sondes (une sonde break-apart et une sonde de fusion) est souvent recommandée afin d'éviter au maximum les résultats de FISH faussement négatifs (56).

2.3.3. Clinique

Cliniquement, les DLBCL *MYCR* disséminent plus fréquemment, et souvent dès le diagnostic, à la moelle osseuse (59% des DH versus 23% des autres DLBCL), au sang périphérique, au système nerveux central et à d'autres sites extra-ganglionnaires variés (47). Les patients sont donc diagnostiqués à un stade avancé (III ou IV selon Ann Arbor), avec un taux de LDH élevé (taux médian de 727 UI/L versus 366 UI/L pour les autres DLBCL, valeur normale < 250 UI/L) et un score IPI intermédiaire haut ou élevé.

D'autres caractéristiques sont aujourd'hui classiques dans ce contexte telles qu'une résistance à la chimiothérapie (seulement 30% de rémission complète environ (21)) ainsi que des rechutes précoces récurrentes. Ni les chimiothérapies à hautes doses, ni le rituximab, ni les greffes de cellules souches n'impactent le pronostic péjoratif de ces pathologies (34)(41).

Cuccuini et al. ont comparé 2 types de chimiothérapies intensives (R ICE et R DHAP) sur des DLBCL *MYCR* en rechute et n'ont pas rapporté d'efficacité supérieure pour l'une ou l'autre des deux (16). Des résultats similaires ont été rapportés par Lin et al. qui ont comparé les protocoles R-CHOP et R-hyper-CVAD (57).

Certaines équipes ont décrit une sensibilité initiale à la chimiothérapie mais admettent malgré tout un taux de rechute très élevé et une évolution inexorablement fatale (11)(50).

Les DLBCL *MYCR* et les DH sont donc décrits comme étant de très mauvais pronostic avec des médianes de survie allant selon les études de 4,5 à 18,5 mois, soit des chiffres beaucoup plus bas que les BL (30 mois) et les autres DLBCL (31 mois) pour un IPI comparable (58).

Les courbes de survie reproduites ci-dessous (figure 11), issues d'une publication de Savage et al. (29), illustrent bien le mauvais pronostic lié au réarrangement de *MYC* avec une survie sans progression à 5 ans de 31% dans le groupe *MYCR* versus 66% dans le groupe non *MYCR* et des survies globales respectives à 5 ans de 33% versus 72%.

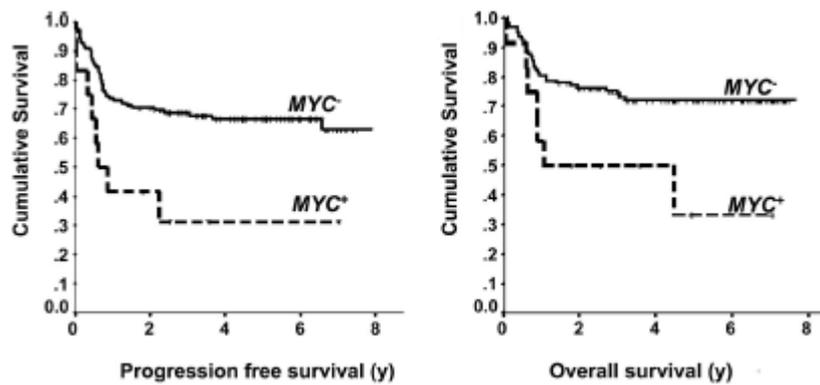


Figure 11 : Survie sans progression et survie globale en fonction de la présence (MYC^+ , trait pointillé, 12 patients) ou non (MYC^- , trait plein, 123 patients) d'un réarrangement de MYC (29)

Les DH ont également, d'après Visco et al., un pronostic bien inférieur aux DLBCL avec réarrangement de $BCL2$ isolé et aux DLBCL de type ABC (figure 12).

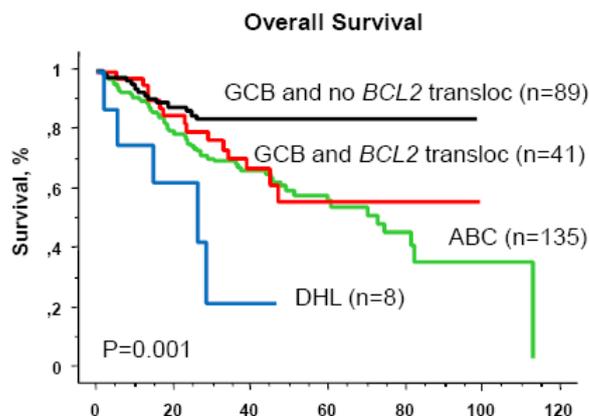


Figure 12 : Survie globale en fonction du type de DLBCL et des translocations présentes (36)

2.3.4. Morphologie et IHC

Les DLBCL MYC^R présentent généralement une morphologie et un phénotype variables, intermédiaires entre BL et DLBCL, ainsi qu'un index de prolifération supérieur à 90%.

Pour rappel, le BL est un LNH très agressif composé de cellules B de taille moyenne, nucléolées, au cytoplasme basophile et vacuolé. Les images de mitoses et d'apoptose sont

récurrentes et l'on observe la présence de macrophages à corps tingibles ingérant les cellules apoptotiques, donnant au prélèvement envahi un aspect de "ciel étoilé" (figure 13). Le profil en IHC est le plus souvent CD20⁺, CD10⁺, BCL2⁻, BCL6⁺, Ig⁺, IRF4/MUM1⁻ ou faible avec une expression du Ki67 proche de 100%.

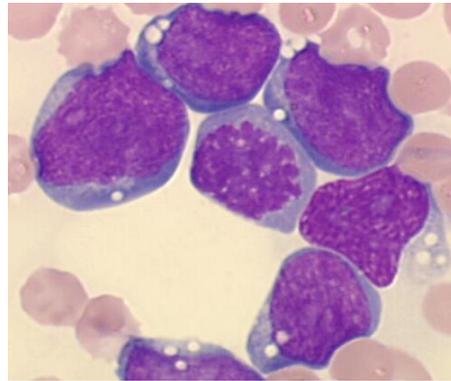


Figure 13 : Cellules de type Burkitt (Photographie : R. Garand)

Les DLBCL classiques quant à eux sont généralement constitués de cellules plus grandes comprenant moins d'images de mitoses et d'apoptose. Cependant, les cellules peuvent parfois être plus petites et il peut exister un fort index de prolifération avec un aspect de ciel étoilé identique au BL. En IHC, le profil montre une expression des marqueurs B, de BCL2, parfois de BCL6 et du CD10. Dans 5 à 10% des cas, CD5 est exprimé, ce qui correspond généralement à un profil ABC caractérisé par un stade plus avancé, une clinique agressive et une résistance au rituximab.

Les cellules de DLBCL *MYC* peuvent donc être de taille moyenne, à cytoplasme basophile et vacuolé, similaires à celles observées dans un BL, ou plus grandes, semblables à celles des DLBCL. Il a même été publié le cas d'un patient qui, sur la même biopsie tissulaire, possédait ces 2 types cellulaires intriqués et porteurs tous deux de la double translocation *MYC-BCL2* (51).

Le profil en IHC peut être celui d'un BL classique ou être atypique. Il existe parfois une expression aberrante de BCL2 qui serait forte dans les DH et TH contrairement aux SH pour lesquels BCL2 serait faiblement exprimé voire négatif (30). Cette observation est en partie corrélée avec la présence ou non d'une translocation du gène *BCL2*. Le CD10 serait moins fréquemment exprimé dans les DH *BCL6* (48).

Malgré leur agressivité, ces lymphomes ont plus communément un phénotype de type GC avec un profil CD10⁺, BCL6⁺, IRF4/MUM⁻ (53) (59). Bien que, dans l'étude de Savage et al., il n'ait pas été retrouvé de différence de répartition GC / non-GC entre les patients *MYCR* et non *MYCR*, les 3 patients DH de l'étude avaient un phénotype de type GC (29).

Comme dans un BL, l'index de prolifération des DLBCL *MYCR* est généralement élevé, avec de nombreuses images de mitoses et d'apoptose. Un Ki67 moyen de 90% est rapporté dans certaines études sur les DH alors que d'autres ne le trouvent supérieur à 80% que dans 20% des cas (47). L'index de prolifération n'est donc pas constamment élevé et varie selon une gamme allant de 40 à 100%. Ce marqueur manque de sensibilité et de spécificité pour détecter à la fois les DLBCL DH et TH et les DLBCL avec hyperexpression de c-myc (60)(61).

Une expression forte de BCL2 ou un Ki67 inférieur à 90% excluraient un BL. En clair, un aspect morphologique proche du BL mais avec un phénotype atypique et un Ki67 inférieur à 95% doit inciter à rechercher les translocations affectant *MYC*, *BCL2* et *BCL6* (62).

Ces lymphomes *MYCR* n'appartenant pas à une entité bien définie peuvent aujourd'hui être classés dans la catégorie provisoire des lymphomes B inclassables (BCLU pour B Cell Lymphoma Unclassifiable), intermédiaires entre DLBCL et LB, selon la classification OMS 2008 (6). Dans cette catégorie figurent les lymphomes ayant une morphologie de DLBCL mais présentant un réarrangement de *MYC*, les lymphomes ayant un aspect de BL pour lesquels aucun réarrangement de *MYC* n'est retrouvé ou plus généralement des lymphomes ayant des caractéristiques cliniques, morphologiques, phénotypiques et génétiques intermédiaires entre BL et DLBCL. L'étude du transcriptome conforte la création de cette catégorie à part car elle montre, pour les BCLU, une signature différente des BL et des DLBCL (23)(57). Aujourd'hui, les DH représenteraient près de la moitié des lymphomes classés BCLU (29)(47). Cependant 5 à 10% des DLBCL de morphologie typique sont aussi *MYCR*.

D'autres experts ont proposé une catégorie de lymphomes B de haut grade inclassables de morphologie blastoïde qui semble proche de celle des BCLU (63). Ceux-ci regroupent également des lymphomes agressifs de novo ou secondaires, le plus souvent de type GC, dont l'index mitotique est élevé et dont l'analyse cytogénétique met en évidence le plus souvent des réarrangements de *MYC* et/ou *BCL2*.

2.3.5. Immunophénotypage

Les LNH de type BL ont généralement, en CMF, un profil B mature CD45⁺, CD34⁻, CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD5⁻, CD23⁻, CD10⁺, sIg⁺, CD79b⁺, FMC7⁺ (64)(65).

Peu d'études abordent l'immunophénotype des DLBCL *MYCR*.

L'étude de Wu et al. portant sur 10 cas de DH montre une diminution variable mais quasi constante de l'expression du CD20 par rapport à ce qui serait attendu pour des lymphocytes normaux ainsi qu'une diminution d'expression variable de CD45 et une expression faible voire absente des Ig (66)(67). Contrairement aux études précédentes, l'étude de Platt et al. (68) ne retrouve pas de différence d'expression de CD45 ni des Ig de surface dans les différents groupes de LNH.

La diminution de l'expression de CD20 dans les DH concorderait avec des analyses concluant au mauvais pronostic des rares DLBCL qui expriment faiblement ce marqueur (69).

Certains articles ont rapporté qu'une diminution d'expression de CD20 et/ou de CD19 (CD20^{dim}, CD19^{dim}) serait fréquente dans les DH et pourrait orienter les cas nécessitant une analyse cytogénétique approfondie. La comparaison des immunophénotypes de DH, BL et DLBCL a montré une différence significative uniquement dans la fréquence de CD19^{dim} entre DH (54%) et BL (9%) ou DLBCL (10%), l'expression de CD20 étant variable dans les DH et les BCLU. En revanche, la diminution concomitante de l'expression de CD19 et CD20 apparaîtrait, dans une minorité de cas mais de façon spécifique dans les DH (68).

La spécificité du profil phénotypique combinant CD19^{dim} et CD20^{dim} parmi les DLBCL CD10⁺ est confirmée dans plus de la moitié des DH testés par Harrington et al. (70) qui retrouvent aussi un CD22^{dim} et de façon comparable aux DLBCL et BL testés l'absence d'expression de CD23. La fréquence de diminution des Ig de surface est plus importante que dans les DLBCL et les BL. CD38 est également très fortement exprimé dans 100% des cas contrairement aux BL. Cette expression forte de CD38 est rapportée aussi bien en IHC qu'en CMF (66).

2.3.6. Cytogénétique

L'agressivité des DH peut s'expliquer en partie par la synergie des translocations impliquant *MYC* et *BCL2* générant à la fois une prolifération cellulaire intense et une inhibition de l'apoptose induite par la chimiothérapie (1). Néanmoins, à cette synergie des réarrangements oncogéniques s'ajoute la globalité et la complexité des anomalies génétiques identifiées (53).

Presque tous les BL ont un réarrangement de *MYC* mais jamais de réarrangement additionnel des gènes *BCL2*, *BCL6* et *ccnd1*. Le caryotype est généralement simple. On observe simplement parfois des gains en 1q, 7q, 12q, 20q, 22q, Xq, des délétions en 6q, 13q, ou 17p (71).

Dans les DLBCL *MYC*R en revanche, le caryotype est quasi constamment complexe, c'est à dire possédant plus de 2 anomalies de structure ou de nombre des chromosomes. On retrouve des réarrangements de *BCL6* et *BCL2* (correspondant pour beaucoup à un lymphome folliculaire transformé), des amplifications de *MYC* et *BCL2* ou encore des inactivations de *TP53* (20% des cas) (31). Dans les DLBCL de type GC, les gains en 2p, 12q et 13q sont fréquents ainsi que les délétions en 10q. Dans le type ABC sont plutôt retrouvés des gains en 3q, 18q et 19q ainsi que des délétions en 6q et 9p (71).

Une étude des réarrangements chromosomiques et du polymorphisme génétique, notamment le nombre de copies des gènes, intéressant *MYC*, *BCL2* et *BCL6* a montré l'existence d'anomalies dans 74% des DLBCL, dont seulement 22% de réarrangements chromosomiques impliquant *MYC*, 23% impliquant *BCL6* et 18% impliquant *BCL2* (47). Cette étude comportait 14% de DH au total. En ce qui concerne l'augmentation du nombre de copies (entre 3 et 6 copies) et l'amplification des gènes (plus de 6 copies), elles sont retrouvées pour *MYC*, *BCL2* et *BCL6* respectivement dans 19%, 28% et 22% des échantillons. Contrairement à ce qui est observé dans les BL, le partenaire de translocation de *MYC* est un gène des Ig dans seulement 50% des cas environ (43% selon Pedersen et al. (46), 56% selon Johnson et al. (34)). Les réarrangements se font plus volontiers avec un gène des chaînes légères des Ig ou avec un gène autre que ceux des Ig.

Une différence de partenaire de *MYC* entre les DLBCL SH ou DH a aussi été rapportée : il y aurait environ 80% de translocation *MYC-IGH* dans les DLBCL SH contre environ 50% dans les DH.

Dans la publication de Johnson et al. portant sur une population de DH *BCL2*, lorsque le partenaire de *MYC* est un gène des Ig, la translocation en cause est une t(8;14) dans 53% des cas, une t(8;22) dans 37% des cas et une t(2;8) dans 10% des cas, c'est à dire respectivement le locus des chaînes lourdes, des chaînes légères lambda et des chaînes légères kappa. Ces proportions très différentes de celles du BL pourraient s'expliquer par la présence initiale de la t(14;18) qui affecte déjà un des loci *IGH*. Cette hypothèse supporte encore la thèse qui décrit le réarrangement de *MYC* comme un évènement secondaire dans la pathogénèse des DH (31).

Dans ce sens, une équipe japonaise a publié un cas de DH pour lequel la découverte des réarrangements de *MYC* et de *BCL2* ne s'est faite qu'à la deuxième rechute d'un lymphome étiqueté Burkitt-like dont le caryotype initial au diagnostic ne montrait qu'une délétion du chromosome Y. Malgré l'absence d'analyses en FISH au diagnostic, les auteurs émettent l'hypothèse d'une acquisition tardive des 2 translocations qui serait contemporaine d'une perte de la chimiosensibilité (72).

Les DH *MYC/CCND1* sont plutôt classés comme des variants de lymphomes du manteau agressifs et de morphologie blastoïde (73)(25). L'activation de *MYC* pourrait donc être aussi un marqueur de progression des lymphomes du manteau (53).

2.3.7. Facteurs pronostiques

L'âge au diagnostic semble être un facteur aggravant sur la survie des DLBCL *MYCR* (27). Plus généralement l'IPI serait toujours prédictif à l'ère du R CHOP (30) pour ces malades mais la présence d'un réarrangement de *MYC* fait chuter encore les taux de survie. On observe que la mise en évidence d'un réarrangement de *MYC* revient approximativement à prédire une survie équivalente à un IPI intermédiaire pour un IPI réel faible et une survie équivalente à un IPI élevé lorsque l'IPI réel est intermédiaire (figure 14) (27).

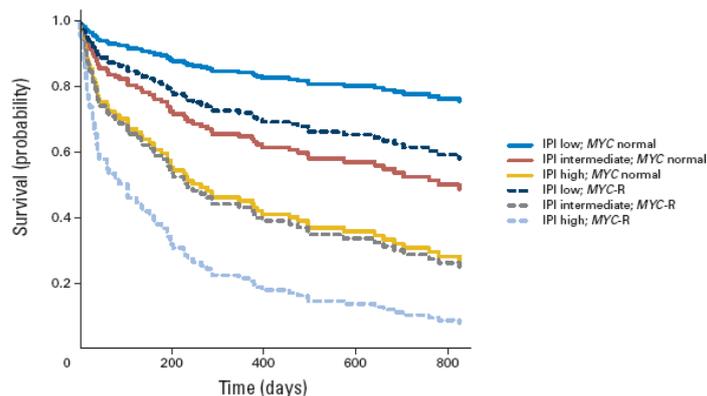


Figure 14 : Survie globale selon l'IPI et le statut de MYC (27)

Pour les DH, l'IPI, et même l'IPI-R, ne semblent pas être prédictifs de l'évolution des patients. En effet, bien que les DH soient regroupés dans le groupe des DLBCL de mauvais pronostic selon l'IPI-R, leur survie est encore très inférieure aux autres DLBCL présents dans le même groupe pronostique (figure 15) (54). Il est donc nécessaire de trouver des facteurs pronostiques propres aux DH, afin de prédire au mieux leur devenir et d'adapter la prise en charge thérapeutique.

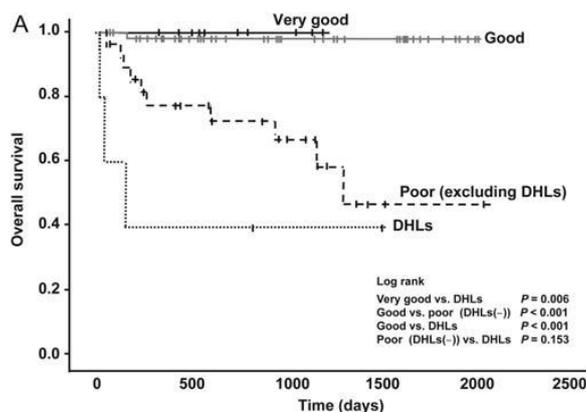


Figure 15 : Survie globale des DLBCL selon l'IPI et la présence de DH (54)

Sur le plan clinique, l'antécédent de lymphome folliculaire semble dans certaines études être un facteur de mauvais pronostic en terme de survie globale par rapport aux DH diagnostiqués de novo (59). Au contraire, dans l'étude de Johnson et al., il n'a pas été observé de différence de survie entre les DH de novo ou ceux survenant au cours de l'évolution d'un lymphome de bas grade (34).

Dans une cohorte de 27 DH, Tomita et al. retrouvent une survie plus longue pour les 2 seuls patients n'ayant pas d'atteinte extra-ganglionnaire au diagnostic (49).

Une morphologie de type DLBCL est, dans certaines études, associée à un meilleur pronostic (34)(47)(52)(74). Une phase leucémique inaugurale serait au contraire associée à une survie inférieure (74).

Pour Akyurek et al. (41), la présence d'un réarrangement de *MYC* dans les DLBCL de type ABC n'aggrave pas la survie. De même, l'impact pronostique lié à la présence d'une t(14;18), quel que soit le type GC ou non-GC, est négligeable.

Pour certains auteurs qui ont étudié récemment l'expression de *BCL2* dans les BCLU, l'hyperexpression de *BCL2* est corrélée à un mauvais pronostic (57)(75). Pour d'autres, cette observation n'existe qu'en présence de réarrangement du gène (figure 16).

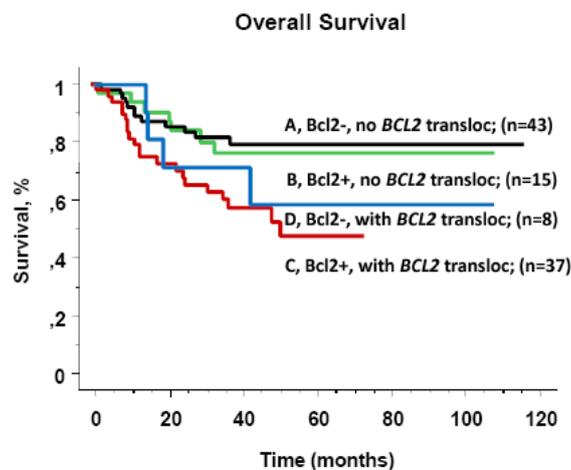


Figure 16 : Survie globale en fonction de l'expression de *BCL2* avec ou sans t(14;18) (36)

Une étude japonaise de Tomita et al. décrit une survie inférieure chez les TH par rapport aux DH (49). Parmi les DH, ceux associés à un réarrangement de *BCL6* seraient de meilleur pronostic que ceux associés à une t(14;18) (76). Au contraire, une communication récente trouve une survie similaire pour les SH et les TH. L'étude isole deux groupes plus à risques : les DH *BCL2* et les DLBCL *MYC*R avec mutation de *TP53*, ces derniers ayant les taux de survie les plus médiocres (77).

Pour démontrer le mauvais pronostic imputable aux doubles translocations et non au caryotype complexe associé, Le Gouill et al. ont comparé une série de 16 DH avec caryotype complexe à 22 patients atteints de DLBCL ayant également un caryotype complexe mais sans réarrangement de *MYC* ni t(14;18) (1). Les DH affichaient un taux de décès de 100% avec une médiane de survie de 4 à 5 mois tandis que les autres patients, avec une médiane de suivi de 17,5 mois avaient un taux de décès de 27% (6/22).

D'autres équipes accordent une valeur péjorative propre au caryotype complexe à la fois dans les DLBCL SH et dans les DH/TH (47).

Récemment, des études sont parues qui ne mettent pas en évidence d'impact additionnel des secondes et troisièmes translocations. Par exemple, Barrans et al., en 2010, n'ont pas observé d'effet additionnel du statut de *BCL2* sur le pronostic (27). De même, Pedersen et al., en 2012, ne trouvent pas différence sur le taux de réponse au traitement et sur la survie globale à un an entre les DLBCL SH et DH, même en individualisant les formes de novo, les syndromes de Richter et les rechutes (46). D'autres auteurs ne notent pas de différence en terme de survie entre SH et DH/TH (16)(30)(57)(78). Dans la même lignée, d'autres (18)(29) décrivent une différence de survie globale et sans évènement significative entre les groupes *MYCR* et non *MYCR* même en excluant les DH.

Au contraire, Green et al. retrouvent un impact péjoratif sur la survie des DH uniquement (28).

Une étude américaine récente (59) conclut sur les BCLU en les considérant comme une entité morphologique et phénotypique indépendante, de mauvais pronostic, indépendamment de l'existence ou non d'anomalies génétiques portant sur les gènes *MYC*, *BCL2* et *BCL6*. En effet, dans cette série de cas, aucune de ces anomalies, seules ou combinées, n'est prédictive de la survie et seul l'IPI a un impact significatif.

Quelques équipes commencent à s'intéresser à l'impact pronostique de la nature du partenaire de translocation de *MYC* (46)(49).

Dans le travail de Tomita et al. cité ci-dessus, l'étude statistique sur les partenaires de translocation de *MYC* ne montre pas de différence de survie entre les translocations t(8;14), t(2;8) et t(8;22).

Dans une étude de Pedersen et al. (46), le partenaire de *MYC* a été identifié pour 14 DH et il s'agit d'un gène des Ig dans moins de la moitié des cas. Chez ces patients, traités par rituximab, il semble que le pronostic soit moins bon lorsque ce partenaire de *MYC* est un gène des Ig (6/6 décédés versus aucun parmi les 8 autres), alors qu'il y a moins de DLBCL transformés dans la série des partenaires Ig que dans celle des partenaires non Ig. Selon ces observations, il est probable que les DH dont le partenaire de *MYC* est un gène autre que ceux des Ig soient sous-estimés au diagnostic car ils ne semblent pas avoir la présentation clinique agressive ni les critères morphologiques et immunohistochimiques conduisant à la recherche de translocations.

Outre le mauvais pronostic, un réarrangement avec un gène des Ig est corrélé, dans cette étude, à un index de prolifération cellulaire plus élevé (Ki67 de 93% versus 58% pour les réarrangements avec un autre gène). Le point de cassure de *MYC* pourrait donc avoir un impact sur le taux de prolifération des cellules lymphomateuses. Tomita et al. ont également trouvé un index de prolifération différent en fonction du type de réarrangement *MYC-IG* (49). Plus précisément, l'index de prolifération serait plus important dans les DLBCL DH avec t(8;14) que dans ceux avec réarrangements *MYC-IGK/IGL*.

Une autre équipe a travaillé sur le partenaire de translocation de *MYC* et l'a déterminé pour 54 cas de DH (de novo et transformés). Il s'agit d'un gène autre que ceux des Ig dans 24 cas soit 44% des DH de l'étude (34). Ce profil cytogénétique *MYC/non-IG*, en plus d'être associé comme précédemment à un meilleur pronostic, serait corrélé à une morphologie de type DLBCL et à une absence d'expression de BCL2 en IHC.

Enfin, de façon inattendue, des équipes rapportent une absence de corrélation entre survie et réarrangement de *MYC* mais un impact des translocations de *MYC* uniquement lorsqu'elles se font avec un partenaire qui est un gène des immunoglobulines (80).

Devant une hétérogénéité importante inter-centre dans l'interprétation de l'expression de certains marqueurs tels que BCL6, une équipe a proposé un score "immuno-FISH" associant la recherche de translocations à l'IHC (81). L'association d'au moins 2 des 3 marqueurs de type non-GC (positivité de FOXP1 et/ou IRF4/MUM1, réarrangement de BCL6) est corrélée à une survie globale inférieure sous R-CHOP, indépendamment de l'IPI.

2.4. DLBCL avec amplification et hyperexpression de MYC

2.4.1. Amplification de MYC

Il existe des patients pour lesquels les techniques de cytogénétique permettent de mettre en évidence des gains (généralement 3 à 4 copies) ou des amplifications (plus de 4 copies) de *MYC* sans que soit retrouvé un réarrangement du gène.

Ces variations du nombre de copies du gène *MYC* semblent avoir des conséquences cliniques similaires aux réarrangements chromosomiques, c'est ce qui a été rapporté notamment par Li et al. (59) qui n'ont pas relevé de différence de survie entre les 2 types de patients.

Pour d'autres, ces amplifications seraient corrélées à un mauvais pronostic (33) (59), quant aux gains, pourtant souvent associés à d'autres altérations génétiques et à une augmentation des ARN messagers de *MYC*, ils n'auraient aucun impact pronostic et se rapprocheraient des DLBCL non *MYC* (30).

Quant à l'étude publiée par Testoni, elle retrouve plutôt un mauvais pronostic de ces anomalies de nombre uniquement lorsqu'elles sont associées à certaines altérations génétiques particulières (82).

L'augmentation du nombre de copies du gène *MYC* a donc également été définie comme un facteur de mauvais pronostic et serait corrélée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de *MYC* (30)(83), indépendamment de la présence de translocations.

De la même manière, il est concevable que les variations du nombre de copies des gènes *BCL2* et *BCL6* aient le même impact pronostic que leurs translocations (59).

2.4.2. Hyperexpression de c-myc

L'identification des DLBCL *MYCR* nécessitant des chimiothérapies intensives n'est pas possible uniquement sur la morphologie des cellules et nécessite à ce jour le recours aux techniques de cytogénétique.

Depuis peu, est testé un nouvel anticorps anti-MYC en IHC (anticorps Y69, Epitomics®) et de nombreuses équipes tentent de corréler l'expression de ce marqueur aux caractéristiques cliniques et cytogénétiques des patients (figure 17).

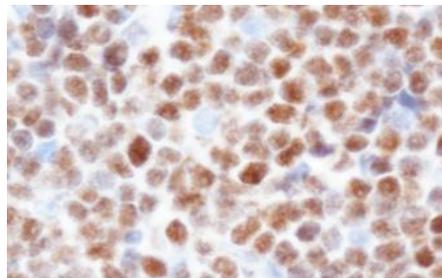


Figure 17 : Immunomarquage par l'anti-MYC (Photographie : A. Moreau)

Concernant la corrélation entre une hyperexpression de c-myc en IHC et la présence d'un réarrangement de son gène en FISH, une étude récente a montré que tous les DLBCL *MYCR* de novo et transformés avaient une forte expression de c-myc dans plus de 50% des noyaux (61).

D'autres auteurs ne retrouvent pas cette hyperexpression de c-myc dans tous les DLBCL *MYCR* (30)(19) et ce profil en IHC est également observé chez une partie des patients non *MYCR*, suggérant l'existence d'autres mécanismes d'hyperexpression de c-myc. Néanmoins, tous ces DLBCL exprimant fortement c-myc en IHC auraient un profil transcriptionnel montrant une activation de *MYC* et une survie globale inférieure, y compris ceux pour lesquels aucun réarrangement de ce gène n'est retrouvé en FISH.

Des conséquences cliniques de l'expression de c-myc seraient observées dès un seuil de 40%, et une expression dans plus de 70% des noyaux serait corrélée à la présence de

translocations (84). Dans cette étude, la présence d'un index de prolifération élevé observé avec l'anti-Ki67 est beaucoup moins spécifique des DLBCL *MYCR* que l'expression de c-myc en IHC. Le Ki67 n'est donc pas un bon marqueur décisionnel pour déclencher la réalisation d'un marquage de c-myc.

D'autres auteurs affirment que le marquage de c-myc en IHC permettrait, avec un seuil de seulement 10%, de différencier un sous groupe de DLBCL au pronostic très défavorable, indépendamment du statut du gène *MYC* (30).

Dans un autre travail est soulignée une fluorescence cytoplasmique de c-myc en absence de réarrangement de son gène et au contraire une expression nucléaire lorsqu'il existe un réarrangement (par exemple dans les BL une fluorescence nucléaire exclusive est observée dans 88% des cas et une fluorescence dans toute la cellule pour les 12% restants). Cette observation pourrait être un bon indice pour déclencher une recherche de réarrangements en FISH (85).

Dans la même lignée, plusieurs études affirment aujourd'hui que l'expression de c-myc et BCL2 serait plus prédictive du devenir des patients que le statut de ces gènes en FISH et il est conseillé à l'avenir un screening des patients en IHC (55). C'est notamment ce que décrivent Johnson et al. qui rapportent que seules les hyperexpressions combinées de c-myc et BCL2 ont un impact sur la survie (86). L'entité des DH est donc en voie de s'étendre aux DLBCL avec hyperexpression de c-myc et BCL2.

Face à un score IPI moins adapté dans le contexte des DLBCL *MYCR*, les équipes tentent de découvrir de nouveaux marqueurs pronostiques plus prédictifs du devenir des patients. C'est le cas des scores obtenus à partir des résultats d'IHC. Par exemple, l'étude de Green et al. propose un score sur 2 points en fonction du niveau d'expression de c-myc et BCL2 en IHC. Un point est attribué pour une forte expression de chacune de ces 2 protéines (seuils de 70% pour c-myc, 40% pour BCL2). La population étudiée regroupe 29% de patients ayant un score de 2 / 2 malgré un taux de DH en FISH de 6% seulement. Une association significative à un mauvais pronostic est retrouvée pour ces patients. Cette observation est confirmée dans l'étude de Johnson et al. qui retrouve 21% de patients positifs pour c-myc et BCL2 en IHC et qui conclut à considérer les hyperexpressions c-myc/BCL2

comme un marqueur prédictif de la survie indépendant de la présence d'un réarrangement de *MYC* en technique FISH (86).

Horn et al. ont également étudié à la fois l'incidence et l'impact pronostic des réarrangements des gènes *MYC*, *BCL2* et *BCL6* ainsi que le niveau d'expression de leurs produits en IHC (19). Comme dans les travaux précédents, l'hyperexpression de ces marqueurs est bien plus fréquente que leurs réarrangements (tableau 9).

	Réarrangement en FISH	Hyperexpression en IHC
<i>MYC</i>	8,8%	31,8%
<i>BCL2</i>	13,5%	79,6%
<i>BCL6</i>	28,7%	82,8%

Tableau 9 : Incidence des réarrangements et de l'hyperexpression des gènes *MYC*, *BCL2* et *BCL6* (19)

Dans cette cohorte, une hyperexpression de c-myc est retrouvée chez près de 70% des patients *MYCR* ainsi que chez un peu plus de 30% des patients non *MYCR*. Le réarrangement de *MYC* ressort comme un facteur de risque significatif indépendant sur la survie globale. En revanche les réarrangements indépendants de *BCL2* et *BCL6* n'ont pas d'impact significatif sur la survie. Concernant l'expression en IHC, 3 facteurs de risques significatifs et indépendants sont mis en évidence : l'hyperexpression de c-myc, l'expression de *BCL2* et l'absence d'expression de *BCL6*. A partir de ces constatations, des scores de risque basés sur les résultats en IHC de l'expression de c-myc, *BCL2* et *BCL6* ainsi que sur les résultats FISH de *MYC* sont proposés et permettent de séparer une population à IPI semblable en 2 groupes de risque différent.

Dans la même idée, Hu et al. publient des résultats sur le point de bouleverser toutes les certitudes admises jusqu'à aujourd'hui sur les facteurs pronostiques des DLBCL (13). En effet, à partir de l'observation d'une plus grande fréquence de coexpression c-myc/*BCL2* dans les DLBCL de type ABC, ils affirment que ce profil double positif (DP) est la cause du mauvais pronostic lié à ce groupe de lymphomes. Dans cette étude, l'hyperexpression isolée de c-myc ou *BCL2* n'a pas d'impact sur la survie et n'est pas plus associée au type GC qu'au type ABC (figure 18).

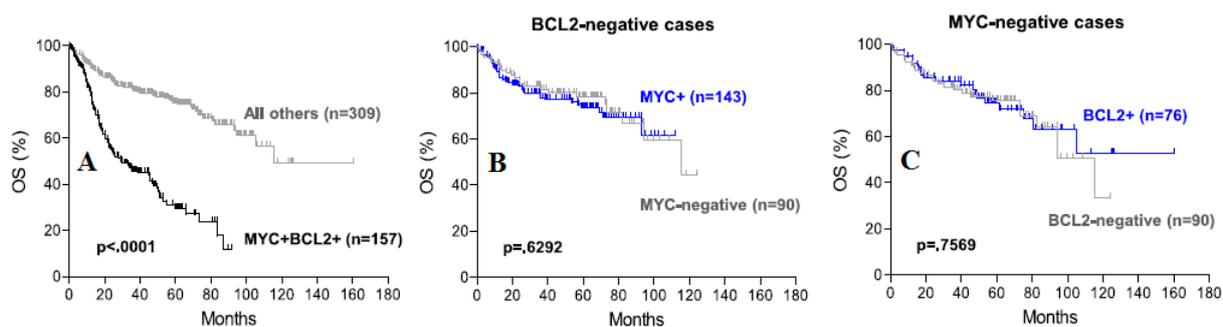


Figure 18 : Survie globale des DLBCL DP comparée aux non DP (A), des DLBCL exprimant uniquement c-myc comparée aux doubles négatifs (B) et des DLBCL exprimant BCL2 uniquement comparée aux doubles négatifs (C) (11).

Lorsque les DP sont exclus, il n'existe plus aucune différence de survie entre les types GC et ABC et, plus troublant, il n'est plus retrouvé de différence de profil d'expression génique entre ces 2 groupes. La double positivité c-myc/BCL2 représenterait près d'un tiers des DLBCL et serait associée à un mauvais pronostic à la fois dans les DLBCL GC et ABC quels que soient l'IPI, les réarrangements présents et le statut mutationnel de *TP53* (figure 19).

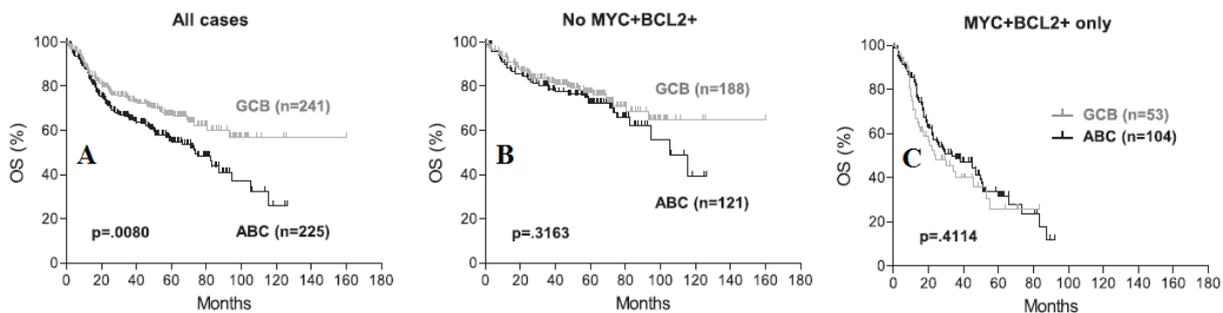


Figure 19 : Survie globale des DLBCL ABC et GC (A), des DLBCL ABC et GC doubles négatifs (B) et des DLBCL ABC et GC DP (C) (15).

3. Objectifs de l'étude

3. Objectifs de l'étude

Devant toutes les remises en question et l'intérêt actuel suscité par les DLBCL *MYCR*, ce travail a pour but de décrire les caractéristiques cliniques, biologiques, morphologiques, phénotypiques et cytogénétiques des patients diagnostiqués avec un DLBCL *MYCR* au CHU de Nantes entre 2000 et 2012.

Des études de survie seront également effectuées pour tenter de dégager des caractéristiques influant sur le pronostic de ces patients et déterminer le type de traitement qui semble le plus efficace.

4. Patients, matériel et méthodes

4. Patients, matériel et méthodes

4.1. Sélection des patients

Les patients inclus dans cette étude sont des adultes ayant un âge compris entre 18 et 80 ans, présentant un lymphome B de haut grade non Burkitt de novo avec réarrangement de *MYC*.

Ils ont été sélectionnés à partir du logiciel FMP utilisé au laboratoire de cytogénétique du CHU de Nantes. Plusieurs recherches à partir de différents mots-clés ont permis de retrouver les patients diagnostiqués avec un réarrangement de *MYC* entre le 1er janvier 2000 et le 31 décembre 2012. Les mots-clés utilisés dans le champ "diagnostic" ont été "haut grade", "Burkitt", "DLBCL" et "LMNH". Une recherche des dossiers pour lesquels "myc" est employé dans la conclusion a permis de compléter la cohorte de patients.

L'examen des courriers et des résultats anatomopathologiques recueillis grâce au logiciel "Clinicom" a permis d'obtenir le diagnostic retenu pour les patients suivis au CHU de Nantes. Pour les patients dont les prélèvements avaient été adressés depuis un centre hospitalier extérieur, les dossiers ont également été consultés afin de pouvoir les inclure à ce travail.

Les critères d'exclusion étaient : un âge inférieur à 18 ans ou supérieur à 80 ans, le diagnostic de BL, un antécédent documenté de lymphome de bas grade (Richter), un dossier incomplet sur le devenir du patient.

Il n'est bien sûr pas exclu qu'il y ait, dans cette série, des patients diagnostiqués d'emblée lors de la transformation d'un lymphome de bas grade, en particulier un lymphome folliculaire lorsqu'il existe une t(14;18). Ces patients ne peuvent pas être différenciés des véritables DH ou TH de novo que ce soit sur la morphologie, l'IHC, la CMF ou encore sur la cytogénétique.

4.2. Recueil des données cliniques et biologiques

Les données retenues pour chaque patient étaient : l'âge au diagnostic, le sexe, les antécédents personnels, le diagnostic anatomopathologique et le matériel tumoral exploité, le PS, le stade selon Ann Arbor, l'IPI, les localisations extra-ganglionnaires, le traitement entrepris et l'évolution.

Les données biologiques recueillies étaient : le taux de LDH, le diagnostic cytologique, le type de matériel étudié et son pourcentage d'envahissement, les résultats de cytométrie en flux (CMF) et les résultats de cytogénétique.

4.3. Anatomopathologie

Les analyses immunohistochimiques ont été recueillies pour les patients dont les prélèvements avaient été adressés au laboratoire d'anatomopathologie. Les données relevées étaient, lorsqu'elles étaient disponibles : le type GC ou non-GC du lymphome, l'expression de BCL2, BCL6, IRF4/MUM1 et MiB1. Les seuils de positivités utilisés étaient de 20 à 30% pour BCL2, BCL6 et MUM1.

Des hybridations supplémentaires en IHC ont été effectuées lorsque du matériel était encore disponible, notamment des hybridations avec l'anticorps ciblant c-myc (Y69). Le pourcentage de positivité pour cet anticorps est rendu dès un seuil de 10%.

4.4. Analyses de cytogénétique

Entre 2000 et 2012, les caryotypes ont été réalisés en bandes R et différents types de sondes ont été utilisés pour les analyses de FISH. Pour connaître le statut réarrangé ou non de *MYC*, *BCL2*, *BCL6* et les gènes des chaînes légères, des sondes de type break-apart ont été utilisées. Les réarrangements *MYC-IGH* et *BCL2-IGH* ont été recherchés avec des sondes de type double couleur-double fusion.

Afin de compléter les données de cytogénétique et d'essayer de mettre en évidence le partenaire de translocation de *MYC*, des hybridations supplémentaires ont été nécessaires.

Elles ont été réalisées sur différents types de prélèvements (sang, moelle osseuse, ganglion, liquide pleural, liquide céphalo-rachidien) conservés dans du fixateur (mélange composé de 3/4 de méthanol et 1/4 d'acide acétique) et congelés à -20°C.

Les sondes utilisées pour ces manipulations supplémentaires sont des sondes locus spécifiques break-apart pour *MYC*, *BCL2*, *BCL6*, *IGH*, *IGK* et *IGL* (Abbott Molecular®, North Chicago, USA ou Dako®, Glostrup, Danemark). Une sonde centromérique a également été utilisée pour le chromosome 8 (CEP8, Abbott Molecular®) ainsi qu'une peinture de chromosome 3 pour pouvoir affirmer le caractère réarrangé de *BCL6* chez 2 patients (Cytocell Aquarius®, Cambridge, UK).

Le mode opératoire suivi pour la FISH est disponible en annexe 2, les références et la cartographie des sondes utilisées en annexe 3.

La lecture a été effectuée sur microscope à fluorescence et les formules FISH ont été établies par comptage de 100 cellules au minimum.

La réalisation de marquages associant la sonde CEP8 et les sondes *IGH* a nécessité quelques tests de mise au point afin de déterminer les proportions dans le mélange pour chaque anticorps, le tampon et l'eau. Il a également fallu tester le programme d'hybridation (température et durée) pour ces sondes habituellement hybridées séparément et selon un programme différent.

Le premier mélange testé comprenait : 1µL de sonde CEP8, 0,25µL de sonde *IgH*, 1µL d'eau et 3,5µL de tampon Vysis. Ce mélange a été dénaturé pendant 4 minutes à 75°C avant d'hybrider pendant 20 heures à 37°C. Le traitement post-hybridation a été celui décrit en annexe et habituellement utilisé pour ces sondes. A la lecture, ce premier test ne s'est pas révélé concluant, la fluorescence rouge trop intense du CEP8 empêchant de visualiser la sonde *IGH*.

La technique a donc été testée avec les mêmes quantités de sonde *IGH*, de tampon et d'eau mais avec des quantités inférieures de CEP8 : 0,5µL et 0,25µL. Dans le premier cas avec 0,5µL de CEP8, les 2 sondes étaient visibles mais l'intensité forte du CEP8 rendait encore la lecture très difficile. Quant au mélange utilisant 0,25µL de CEP8, il s'est révélé être le plus adapté avec un centromère toujours bien visible et une visualisation correcte des 2 fluorochromes de la sonde break-apart *IGH*.

4.5. Cytométrie en flux

Les immunophénotypages, lorsqu'ils ont pu être réalisés, ont été effectués sur des cytomètres Becton Dickinson© (San Jose, USA). Le FACSCalibur™ (cytomètre 4 couleurs) a été utilisé jusqu'en mai 2006, puis le FACSCanto I™ (6 couleurs) de juin 2006 à février 2007 et enfin le FACSCanto II™ (8 couleurs) jusqu'à aujourd'hui.

Les échantillons analysés sont de différentes natures selon la localisation du lymphome : sang, moelle osseuse, liquide pleural, liquide céphalo-rachidien.

Le panel d'anticorps utilisé regroupe les marqueurs suivants : CD45, CD19, CD5, CD10, CD20, CD22, CD23, CD79b, FMC7, chaînes légères des Ig, CD38, et pour les plus récents parfois le CD81 et le CD43.

L'interprétation s'est faite sur les logiciels CellQuest™ Pro (pour les immunophénotypages effectués sur FACSCalibur) ou FACSDiva™ (pour les immunophénotypages effectués sur FACSCanto I et II). Le ciblage de la population cellulaire d'intérêt s'est faite sur la morphologie (taille et structure) puis sur l'expression de CD45 et de CD19.

Le tableau en annexe 4 comporte les valeurs seuils servant à l'interprétation des mxdf pour chaque anticorps. La RFI est le quotient de la MFI d'un anticorps pour la population donnée sur la MFI du contrôle négatif pour le fluorochrome associé à cet anticorps.

4.6. Analyse statistique

L'ensemble des données a été recueilli à l'aide d'un e-CRF (pour Electronic - Case Report Form) sur le logiciel Webtrial (Quanticsoft, Nantes, France). Des extractions au format Excel ont permis les analyses ultérieures de la base validée.

Les différentes analyses statistiques et analyses de survie ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® (GraphPad Software, La Jolla, USA).

La survie globale a été calculée entre la date de diagnostic et soit la date de décès du patient, soit le dernier point de suivi. Les courbes de survie ont été tracées selon la méthode de Kaplan-Meier et comparées entre elles avec le test du Logrank.

Les analyses de comparaison de variables qualitatives ont été effectuées selon les effectifs avec le test exact de Fisher ou le test du chi-deux.

L'étude de la distribution des variables quantitatives a été réalisée avec les tests de Mann-Whitney ou, si plus de 2 groupes devaient être comparés, avec le test de Kruskal-Wallis.

Les résultats ont été considérés comme significativement différents pour une p-value inférieure à 0,05 ($P < 0,05$).

5. Résultats

5. Résultats

5.1. Patients

La recherche, parmi plusieurs centaines de réponses aux différentes requêtes effectuées sur FMP, a permis de retrouver 126 patients présentant un réarrangement de *MYC*. Parmi ceux-ci ont été exclus : 34 enfants de moins de 18 ans et 6 adultes de plus de 80 ans. L'analyse des dossiers cliniques a ensuite permis d'exclure 44 BL et 5 syndromes de Richter. Tous les dossiers restants ont pu être consultés à l'exception d'un, exclu car trop incomplet.

La cohorte étudiée regroupe donc au final 36 patients ayant un DLBCL diagnostiqué entre le 1er janvier 2000 et le 31 décembre 2012 et chez qui a été mis en évidence un réarrangement de *MYC*.

5.2. Données cliniques

Les caractéristiques cliniques des patients ainsi que leur traitement et leur devenir sont présentés dans le tableau situé en annexe 5. Les patients étudiés ont un âge médian de 65,2 ans avec un âge minimum de 36,5 ans et un âge maximum de 76,7 ans. Il existe une prédominance masculine avec un sex ratio de 1,6.

Au diagnostic, les facteurs de mauvais pronostic sont fréquents. Le PS est supérieur à 2 dans 31% des cas, seuls 2 patients ne sont pas diagnostiqués au stade IV selon Ann Arbor (94,4% de stades IV) et seul un cas n'a pas un taux de LDH élevé au diagnostic (97% des cas : taux de LDH supérieur à la normale).

Les localisations extra-ganglionnaires (LEG) sont présentes dans 94% des cas (34/36), il existe un envahissement médullaire dans 77% des cas et une atteinte méningée dans 36% des cas. Les autres localisations retrouvées parmi ces patients sont pleurales (5 cas), abdominales (5 cas), spléniques (5 cas), hépatiques (4 cas), rénales (3 cas), cutanées (3 cas), surrénaliennes (2 cas), intestinale (1 cas), ovarienne (1 cas) et testiculaire (1 cas).

En prenant en compte ces données, 5 patients ont un IPI intermédiaire faible, 11 un IPI intermédiaire haut et 16 un IPI haut. Le taux de LDH n'est pas connu pour une des patientes,

et ne permet donc pas de calculer l'IPI précisément : celui-ci est intermédiaire avec un score de 2 ou 3.

Parmi les 34 patients pour lesquels les antécédents personnels ont pu être analysés en détail, aucun ne présente de déficit immunitaire ou d'infection. Une exposition à l'amiante est signalée pour 3 d'entre eux et 2 autres ont un antécédent de tumeur solide en rémission complète : cancer du sein traité par radiothérapie et exérèse chirurgicale pour l'un, carcinome du voile du palais traité par chimiothérapie pour l'autre.

Les chimiothérapies mises en œuvre sont variables et font appel selon les cas à des polychimiothérapies classiques ou à des traitements plus intensifs similaires à un traitement de BL. Parmi les 36 patients, 2 n'ont reçu qu'un traitement palliatif et 2 autres n'ont reçu qu'une cure de COP ou R COP puis sont décédés avant de pouvoir commencer l'administration d'autres protocoles chimiothérapeutiques. Les chimiothérapies proposées associent donc des traitements standard de lymphomes comme les polychimiothérapies de type CHOP, R CHOP, DHAP, DHAC, R DHAC, MTX ou GEMOX pour 13 patients et des traitements standard de lymphomes agressifs de type COPADEM, R COPADEM, R CEEP, MTX ARAC, CYM, CYVE ou R CYVE pour 18 patients. Le rituximab a été utilisé chez 28 d'entre eux. Le type de chimiothérapie reçue entre le COP et l'autogreffe pour le patient n°1 n'a pas été retrouvé. Enfin, 12 patients ont reçu une greffe de CSH en première ligne de traitement (6 autogreffes, 3 allogreffes, 3 autogreffes puis mini-allogreffes).

L'évolution du lymphome *MYCR* a été fatale pour 31 des 36 patients avec une survie globale allant de 9 jours à 32,1 mois pour une médiane 5,9 mois. Les 5 autres patients sont encore en vie au terme d'un suivi allant de 14,4 à 81,6 mois pour une médiane de 29,5 mois. Ces patients sont en rémission complète à la date des dernières nouvelles pour 4 d'entre eux, le cinquième étant en rechute après une première rémission complète et une survie sans évènement d'environ 77 mois.

Parmi les 32 patients traités, 20 ont pu atteindre une rémission partielle ou complète avant de rechuter précocement pour 13 d'entre eux. Les 12 autres patients ont été en échec de traitement avec une progression de la maladie sous chimiothérapie. Le taux de réponse, au moins partielle et temporaire, au traitement dans cette étude est donc de plus de 60%.

Pour cette cohorte de patients, comme précédemment décrit pour ce type de DLBCL, il n'existe pas de corrélation entre l'IPI et la survie ($P = 0,40$). Il en est de même en utilisant l'IPIa pour les patients de moins de 60 ans, bien que la courbe semble un peu plus prédictive. Cette réévaluation permet de reclasser 5 des 14 patient concernés dans un groupe de risque plus élevé (figure 20, $P = 0,11$).

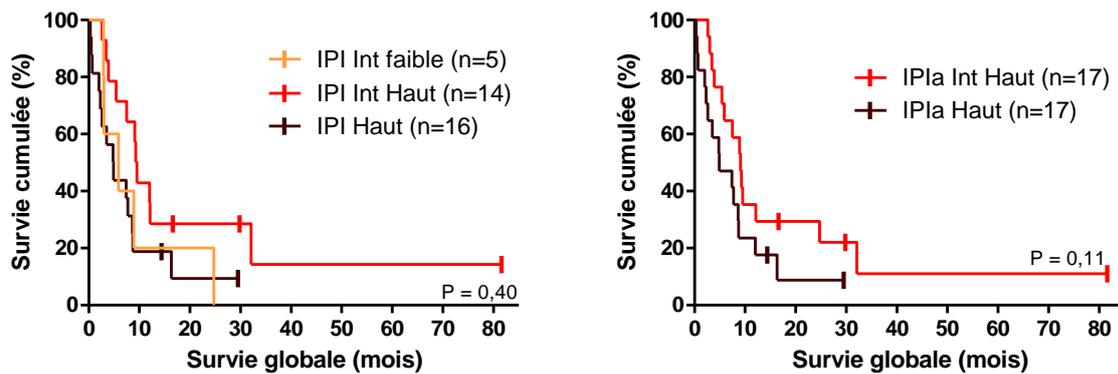


Figure 20 : Survie globale en fonction du risque calculé par l'IPI et l'IPIa

Les caractéristiques cliniques que sont le PS, l'envahissement médullaire ou méningé et le nombre de localisations extra-ganglionnaires n'ont aucune lien significatif avec la survie (figures 21 et 22). En particulier, les patients encore en vie au terme du suivi n'ont pas forcément des caractéristiques de bon pronostic : 2 ont un PS supérieur à 2 au diagnostic, 3 ont plus de 2 localisations extra-ganglionnaires, 4 ont une atteinte médullaire et 3 une atteinte méningée.

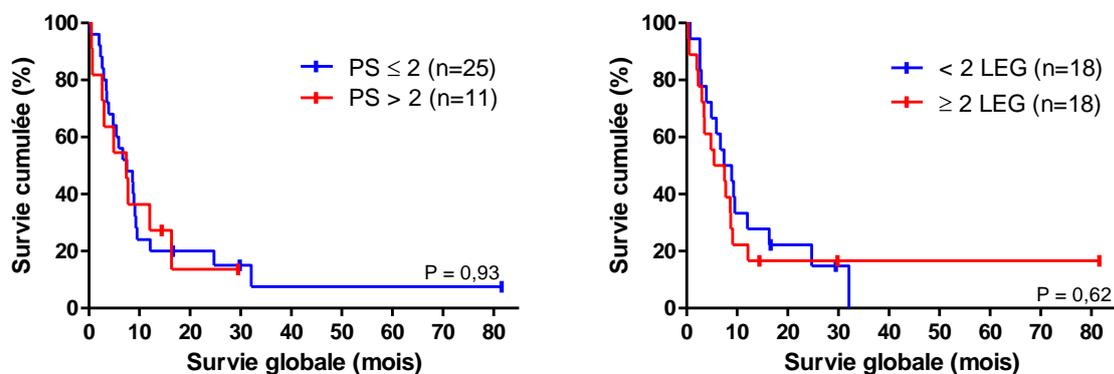


Figure 21 : Survie globale en fonction du PS et en fonction du nombre de localisations extra-ganglionnaires (LEG)

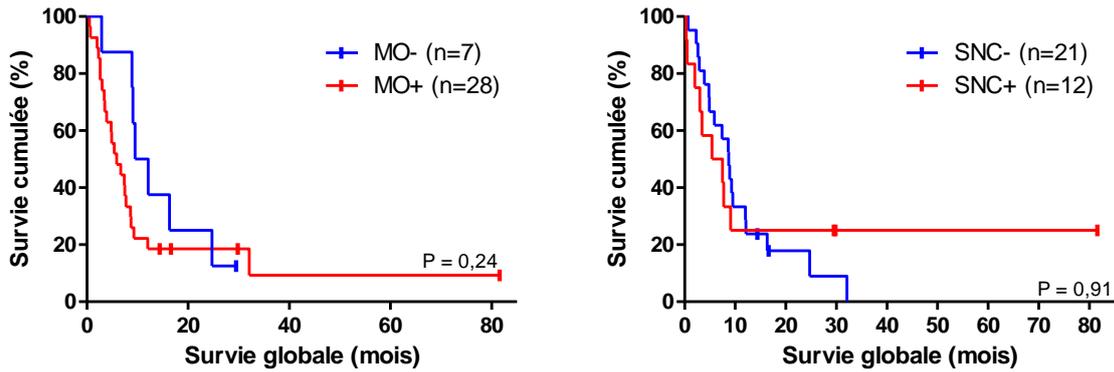


Figure 22 : Survie globale en fonction de l'envahissement médullaire (MO) et en fonction de l'envahissement méningé (SNC).

L'analyse de l'impact d'un envahissement médullaire pour un même IPI montre une différence significative uniquement pour les patients ayant un IPI haut, sous réserve des effectifs faibles (figure 23).

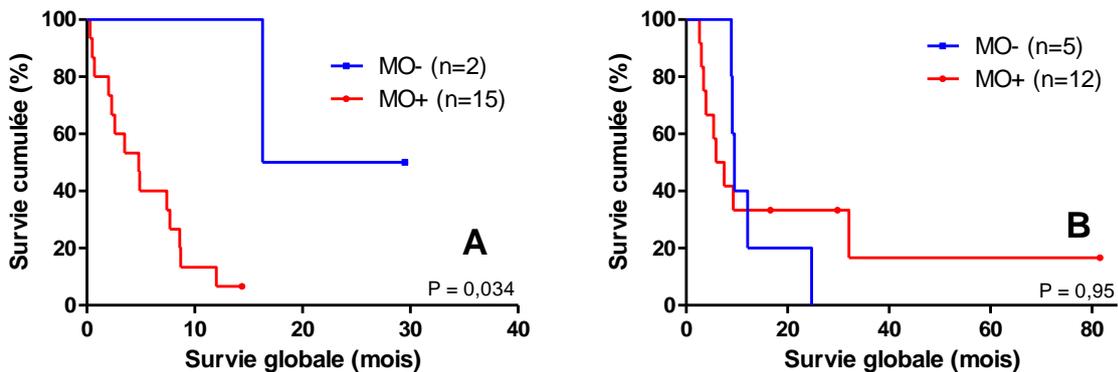


Figure 23 : Survie globale en fonction de la présence (MO+) ou non (MO-) d'un envahissement médullaire pour un IPI identique. A : IPI haut. B : IPI intermédiaire haut.

En revanche, l'analyse statistique de la survie selon 2 groupes d'âge montre une différence significative pour un seuil fixé à 65 ans (figure 24). Ce seuil a été choisi car il correspond à la médiane d'âge au diagnostic des patients et permet donc de séparer la cohorte en 2 groupes de populations égales. La médiane de survie est alors de 9 mois pour les patients de moins de 65 ans versus 5,1 mois pour les patients plus âgés ($P = 0,028$). Il est à noter que les 5 patients encore en vie ont tous moins de 65 ans. Les taux de survie globale à 1 et 2 ans sont respectivement de 39% versus 11% et 25% versus 5,5%. Ces différences de survie ne

sont pas significatives ni pour un âge seuil fixé à 60 ans, tel qu'il l'est dans l'IPI, ni pour un âge seuil fixé à 70 ans ($P = 0,12$).

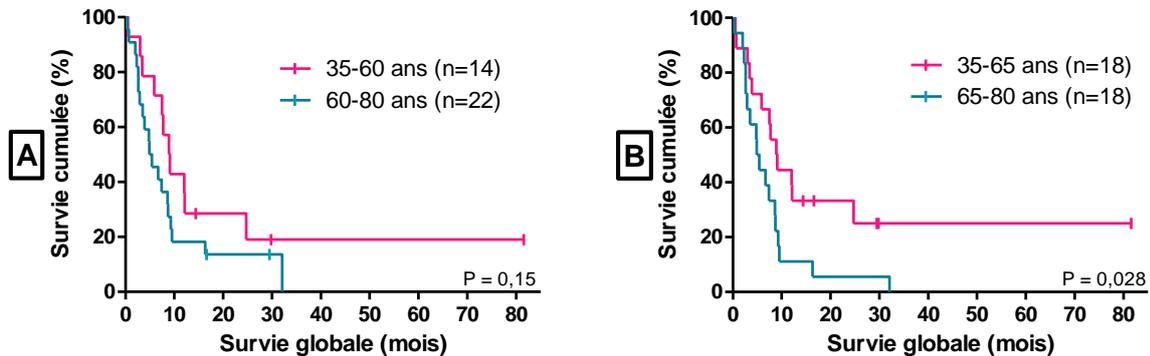


Figure 24 : Survie globale selon l'âge (seuils de 60 ans (A) et 65 ans (B))

Pour savoir si ce seuil de 65 ans donne de nouveau une significativité à l'IPI, l'IPIa a été élargi et recalculé pour tous les patients de moins de 65ans (IPIa⁶⁵). Cette révision de l'IPI au profit de l'IPIa⁶⁵ pour les patients âgés de 60 à 65 ans ne modifie pas leur groupe de risque intermédiaire haut ou haut. La courbe de survie reste donc strictement identique à celle utilisant l'IPIa.

Afin de comprendre pourquoi les patients de plus de 65 ans ont une survie globale inférieure, les différents facteurs de risque cliniques ont été analysés en comparaison avec les patients de moins de 65 ans.

La comparaison des proportions de patients ayant un envahissement médullaire, un envahissement méningé, des localisations extra-ganglionnaires multiples ou un PS supérieur à 2 ne montre pas de différence significative entre patients de plus de 65 ans et patients de moins de 65 ans (figure 25). Au contraire, hormis pour l'envahissement médullaire, tous ces facteurs de risque semblent plus rares pour les patients de plus de 65 ans. Le stade selon Ann Arbor et le taux de LDH étant élevés pour presque tous les patients, la comparaison statistique en fonction de l'âge est inutile.

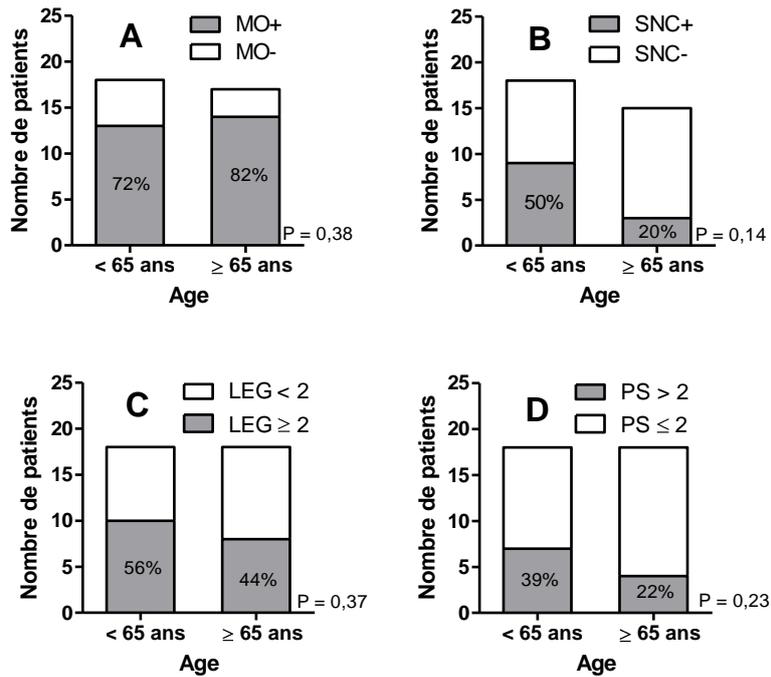


Figure 25 : Comparaison de l'incidence en fonction de l'âge : A - Envahissement médullaire (MO), B - Envahissement méningé (SNC), C - localisations extra-ganglionnaires (LEG) et D - PS.

Bien que tous ces critères qui intègrent le calcul de l'IPI soient plutôt moins présents chez les patients de plus de 65 ans, leur IPI semble tout de même plus élevé probablement à cause du calcul en en lui même qui attribue des points supplémentaires en prenant en compte l'âge et le nombre de localisations extra-ganglionnaires (figure 26).

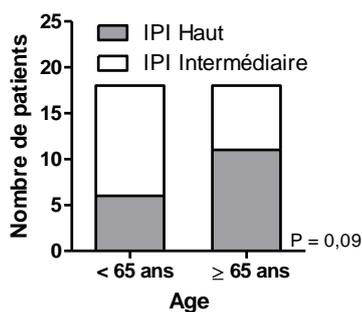


Figure 26 : Répartition des IPI et IPIa intermédiaires ou élevés en fonction de l'âge.

Quant au traitement, bien que ce soit probablement lié au faible nombre de patients, il n'y a pas de différence significative entre les proportions de patients traités par chimiothérapie standard versus chimiothérapie intensive selon l'âge (figure 27A). Il en est de même pour le rituximab qui est utilisé largement quelle que soit la classe d'âge (figure 27B).

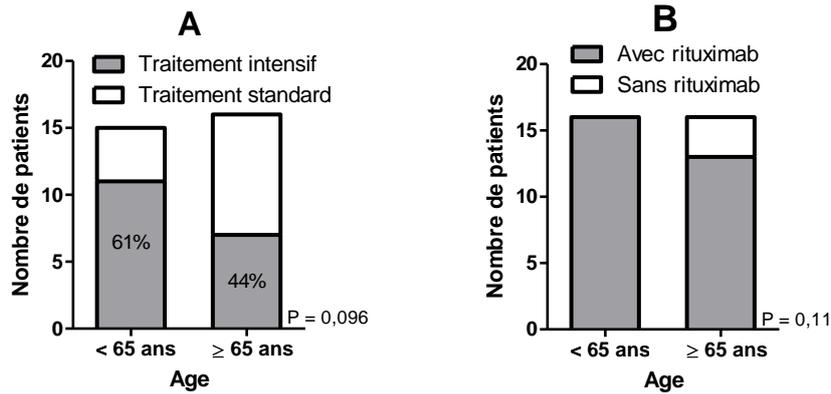


Figure 27 : Répartition du type de traitement standard versus intensif (A) et avec ou sans rituximab (B) selon l'âge.

En revanche, et de façon logique, la greffe de CSH ne concerne que des patients âgés de moins de 65 ans et représente 12 patients sur les 18 de cette classe d'âge.

Comme précisé précédemment, 28 des 31 patients traités ont reçu une polychimiothérapie associée à du rituximab. Les courbes de survie globale comparées avec et sans rituximab montrent une différence de survie significative bien qu'il n'y ait que 3 patients dans le bras sans rituximab ($P = 0,028$). Les médianes de survie avec et sans rituximab sont respectivement de 8,8 et 2,6 mois (figure 28).

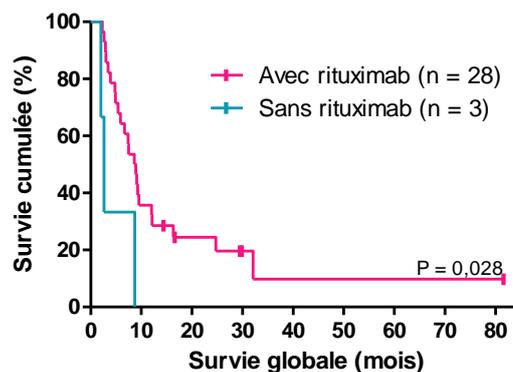


Figure 28 : Comparaison de la survie globale avec et sans rituximab

La survie globale a ensuite été analysée en fonction du type de traitement : standard ou intensif, puis chacun de ces types de traitement a été comparé seul ou associé à une greffe de CSH.

La comparaison traitement standard versus traitement intensif en considérant toute la population de patients n'est, étrangement, pas significative et les courbes sont même quasi identiques. Pourtant, en incluant à cette étude de survie globale les patients de plus de 65 ans précédemment qualifiés de plus mauvais pronostic et, ces mêmes patients étant à la fois moins souvent traités par chimiothérapie intensive et jamais greffés, il aurait été légitime de s'attendre à une nette supériorité du traitement intensif versus traitement standard. Cette courbe souligne encore le mauvais pronostic de la pathologie quel que soit le traitement instauré (figure 29A).

En séparant les patients selon les tranches d'âges habituelles (plus ou moins de 65 ans), il n'y a pas de non plus de supériorité significative de l'un ou l'autre des traitements. De façon surprenante, les patients de plus de 65 ans recevant un traitement standard sembleraient même survivre plus longtemps (médiane de survie de 7,4 mois) que ceux sous chimiothérapie intensive (médiane de survie de 2,9 mois) (figure 29B), probablement en raison d'une moindre résistance aux toxicités. De plus, les 5 patients de cette catégorie d'âge ayant atteint une rémission complète à un moment donné ont tous été traités par chimiothérapie standard.

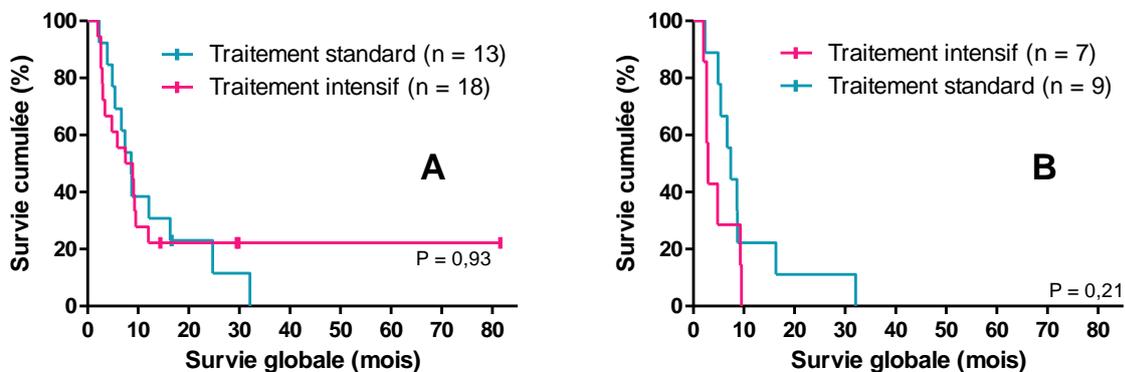


Figure 29 : Comparaison de la survie globale en fonction du type de traitement dans la cohorte entière (A) et chez les patients de plus de 65 ans (B)

Pour les 4 patients de moins de 65 ans traités et non greffés, la différence entre traitement standard et intensif n'est pas non plus significative ($P = 0,65$) mais on observe des médianes de survie respectives de 3,9 et 7,5 mois, avec cette fois-ci une tendance à un avantage de survie sous traitement intensif.

La comparaison de la survie globale entre patients greffés quel que soit le type de greffe et patients non greffés n'a d'intérêt que chez les patients de moins de 65 ans. En effet, cette étude sur la cohorte globale reviendrait plus ou moins à comparer de nouveau les patients selon leur âge, les deux tiers des patients étant greffés dans le bras de moins de 65 ans et aucun dans le bras de plus de 65 ans.

Chez les patients de moins de 65 ans, la différence greffe versus non greffe en terme de survie globale est très significative ($P = 0,016$). Les 5 patients vivants au terme du suivi ont d'ailleurs été greffés. La greffe apporte un bénéfice avec une médiane de survie de 18,4 mois versus 5,7 pour le bras non greffé (figure 30A). Cette observation est renforcée par une survie similaire des patients non greffés quel que soit leur âge avec des courbes de survie qui se confondent (figure 30B).

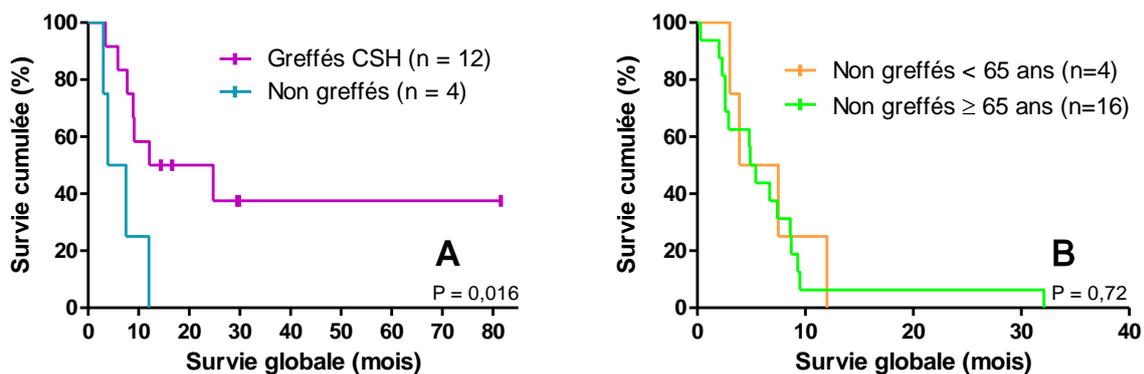


Figure 30 : Comparaison patients greffés versus non greffés chez les moins de 65 ans (A) et comparaison de la survie des patients non greffés selon leur âge (B)

L'étude du type de greffe employé ne montre pas de différences significatives, probablement à cause du trop faible nombre de patients observés (figure 31). Néanmoins, pour ces quelques patients, la survie semble meilleure lors de la réalisation d'une séquence de traitement autogreffe plus mini-allogreffe qu'avec une autogreffe seule ou une allogreffe d'emblée. Dans ce bras autogreffe plus mini-allogreffe, 2 des 3 patients sont encore en vie au terme d'un suivi de 14,4 et 29,8 mois. La médiane de survie du groupe des allogreffés n'est que de 5,9 mois versus 18,4 mois pour celui des autogreffés. Néanmoins, la patiente encore en vie au terme de près de 7 ans de suivi a été allogreffée d'emblée.

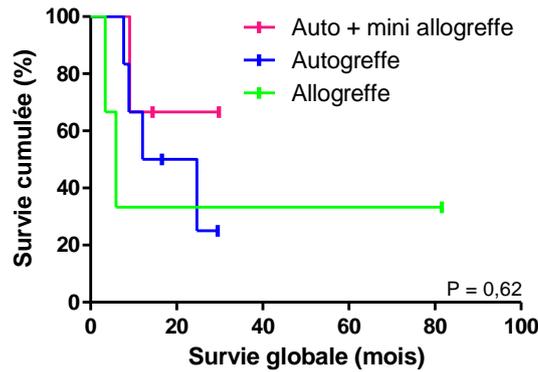


Figure 31 : Survie globale en fonction du type de greffe de CSH

Lorsque l'on compare la survie entre un groupe traitement standard seul ou associé à la greffe, la greffe semble là encore apporter un avantage de survie. Malgré un P non significatif, les médianes de survie sont respectivement de 24,7 et 7,1 mois pour les patients greffés et non greffés (figure 32). Il est à noter que le seul patient de moins de 65 ans non greffé dans ce groupe de traitement standard a une survie de 3,9 mois contre une médiane de 24,7 mois pour les 3 patients autogreffés du même groupe, ce qui renforce là encore le rôle de la greffe.

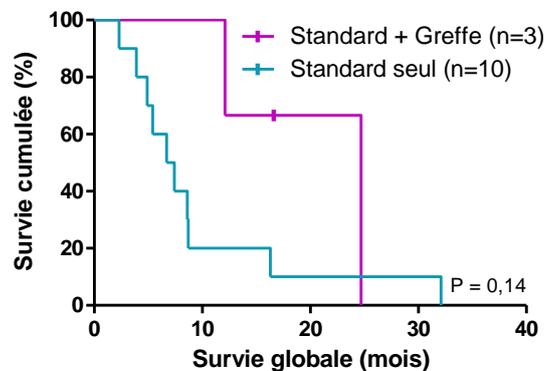


Figure 32 : Impact de la greffe associée à un traitement standard chez les patients de tous âges

Dans le groupe de traitement intensif, lorsque l'on compare les 3 patients de moins de 65 ans ayant eu une chimiothérapie seule à ceux ayant eu, en plus, une greffe de CSH, la différence de survie n'est pas significative non plus (figure 33). Cependant, les médianes de survies respectives de 45,4 mois pour le bras greffé contre 7,5 mois pour le bras non greffé sont assez parlantes. Avec 50% de survie à un an, ce groupe traitement intensif associé à une greffe de CSH est celui donnant les meilleurs résultats.

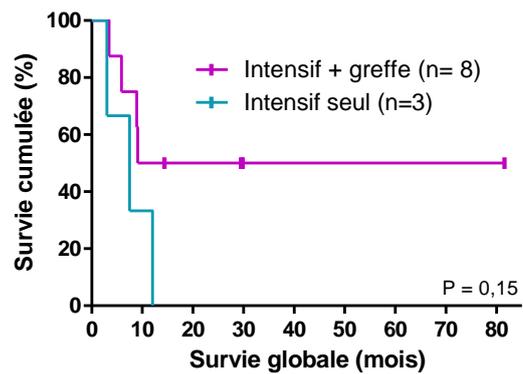


Figure 33 : Impact de la greffe associée à un traitement intensif chez les patients de moins de 65 ans

5.3. Anatomopathologie

Des prélèvements ont été adressés dans un laboratoire d'anatomopathologie pour 26 patients de la cohorte, permettant de poser dans la plupart des cas le diagnostic de DLBCL ou de BCLU. Les dossiers des patients pour lesquels il restait du matériel exploitable au CHU de Nantes ont pu être complétés, notamment par la réalisation de l'immunomarquage de c-myc en IHC. Les résultats sont consultables en annexe 6.

Le type de DLBCL a pu être déterminé pour 14 patients. Il s'agit dans la majorité des cas de DLBCL de type GC (12/14). CD10 est donc positif dans la plupart des cas ainsi que BCL6. Le marqueur MUM1 quant à lui est le plus souvent négatif.

L'expression de BCL2 est positive dans 12 des 18 cas pour lesquels elle est connue.

L'index de prolifération estimé grâce au MiB1 est supérieur à 50% pour les 16 patients pour lesquels ce marquage a été effectué. La pathologie est le plus souvent très proliférante avec une positivité supérieure à 80% pour 13 cas sur 16.

Le marquage anti-MYC a pu être effectué pour 10 patients mais n'est pas interprétable pour 2 d'entre eux. Pour les 8 restants, l'expression de c-myc est toujours positive avec un minimum de 30% pour 2 patients, les 6 autres étant supérieurs à 70%.

La survie globale des 12 patients GC et des 2 patients non-GC est la même avec des médianes de survie similaires, respectivement de 8,4 et 9,1 mois.

L'étude de l'impact de l'expression de BCL2 n'est pas significative faute d'un effectif suffisant. Cependant, il semble qu'il y ait un léger avantage de survie au profit des patients BCL2 négatifs (figure 34). Les médianes de survie sont de 7,4 mois et 12,1 mois.

L'index de prolifération Ki67 étant supérieur à 50% pour tous les patients chez lesquels il a été réalisé, la survie a été comparée entre les 3 patients pour lesquels il est inférieur à 80% et les 13 autres. Il n'y a pas dans cette cohorte de plus mauvais pronostic au-delà d'un seuil de Ki67 de 80% ($P = 0,34$).

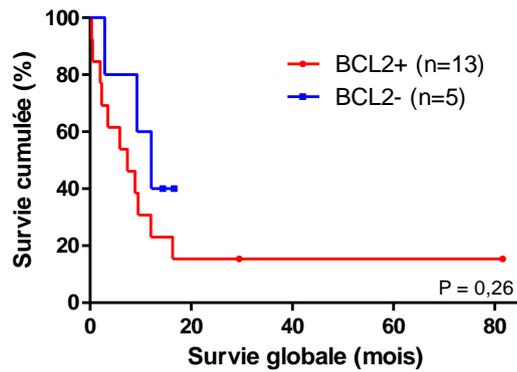


Figure 34 : Impact de l'expression de BCL2 sur la survie

De même, l'expression de c-myc n'est pas corrélée à la survie pour le seuil de 40% proposé par Thieblemont et al. (84). Ce marqueur étant assez fort chez tous les patients de la cohorte, il n'est pas possible d'étudier la corrélation entre la survie et le seuil de 10% récemment proposé par une autre équipe (30). Cependant, si l'expression de c-myc devait être un argument décisionnel pour la recherche de réarrangements de *MYC*, il faudrait d'après cette cohorte proposer un seuil assez bas, 2 des 8 patients étudiés ayant une expression de ce marqueur autour de 30%.

Un marquage associé de c-myc et BCL2 n'a été réalisé que pour 8 patients. La comparaison entre les 6 patients ayant une coexpression c-myc/BCL2 et les 2 patients n'exprimant que c-myc est donc difficile. Il est simplement possible d'observer les médianes de survie qui sont respectivement de 10,7 et 6,5 mois pour les patients n'exprimant que c-myc et ceux coexprimant à la fois c-myc et BCL2 ($P = 0,77$).

5.4. Cytogénétique

Les données de cytogénétique auxquelles s'intéresse cette étude sont les résultats de FISH pour *MYC*, *BCL6* et la t(14;18), le caryotype et la recherche du partenaire de translocation de *MYC*. En associant une ré-analyse détaillée des images de caryotypes et de FISH réalisés au diagnostic à des hybridations complémentaires en FISH, les dossiers de cytogénétique ont été complétés au maximum des possibilités (résultats en annexe 7). En effet, lorsque la disponibilité du matériel le permettait et que, en fonction des premiers résultats, des manipulations supplémentaires pouvaient s'avérer judicieuses pour apporter les précisions recherchées, celles-ci ont été effectuées. Des images des différents types de configurations observées pour les sondes break-apart sont insérées sur la figure 35.

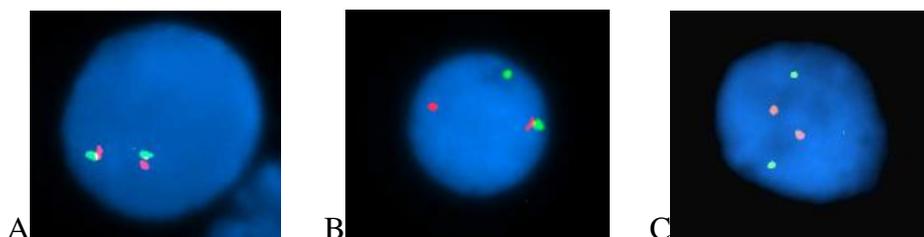


Figure 35 : Exemples de configuration pour des sondes break-apart.

A : Sonde *BCL6*. 2 fusions : absence de réarrangement (patiente n°21)

B : Sonde *MYC*. 1 fusion, 1 orange, 1 vert : réarrangement d'un gène (patiente n°3)

C : Sonde *IGL*. Absence de fusion, 2 oranges, 2 verts : 2 gènes réarrangés (patient n°10)

Dans la cohorte, les 24 patients pour lesquels le caryotype est interprétable ont un caryotype complexe. Parmi ces 24 patients, il y en a 5 pour lesquels la grande complexité des anomalies présentes ne permet pas d'établir une formule cytogénétique. Cinq autres patients ont fait l'objet d'une tentative de caryotype qui s'est soldée par un échec en raison d'une absence de mitoses observables. Pour les 7 cas restants, les caryotypes n'ont pas pu être réalisés faute de matériel disponible pour la mise en culture. Ces derniers patients ont en effet été étudiés, sur des lames d'apposition transmises par les laboratoires de cytologie ou d'anatomopathologie, permettant la réalisation d'hybridations en FISH uniquement. Pour les patients n°3 et 22, bien que les caryotypes n'aient respectivement pas été réalisés ou aient échoué, la présence d'un profil TH permet de leur attribuer un caryotype complexe. De même pour le patient 14 chez qui il existe des réarrangements de *MYC* et *IGK* ainsi que la perte d'un

signal pour *BCL2* et *IGL*. Les caryotypes complexes représentent donc au minimum 27 patients sur les 36 étudiés (75%), et probablement beaucoup plus.

Les anomalies retrouvées en dehors des altérations logiquement présentes sur les chromosomes 2, 3, 8, 14, 18 et 22 sont variables. Certaines sont un peu plus récurrentes et les chromosomes les plus touchés sont les chromosomes 1, 4, 6, 7, 9, 11 et 13 (trisomies, additions, délétions, duplications, translocations selon les cas). Aucune délétion 17p du gène *TP53* n'a été mise en évidence parmi les caryotypes dont la formule cytogénétique a pu être établie.

Concernant la technique FISH, des résultats complets pour la t(14;18), *MYC* et *BCL6* ont pu être obtenus suite à des hybridations complémentaires pour 35 des 36 patients.

Pour le cas n°2, la cellularité du matériel restant étant insuffisante, la FISH réalisée a été un échec. Le laboratoire d'anatomo-pathologie ne disposant pas non plus de matériel, le statut de *BCL2* et *BCL6* reste donc indéterminé. Néanmoins, pour cette patiente, la présence d'anomalies au caryotype sur les loci 3(q25-26) et 14(q32) laisse à penser qu'il s'agit probablement d'un DH voire d'un TH.

Pour les 35 autres cas, la FISH a permis de mettre en évidence 9 cas de SH, 17 cas de DH et 9 cas de TH. Parmi les 17 cas de DH, 12 ont une t(14;18) et 5 un réarrangement de *BCL6* associés au réarrangement de *MYC*. Les DH et TH représentent donc 72% des DLBCL *MYCR* de novo de cette cohorte. Parmi ces DH et TH, il y a 46% de DH *BCL2*, 19% de DH *BCL6* et 35% de TH.

Le partenaire de translocation de *MYC* a pu être identifié pour 23 patients. L'observation du caryotype et des mitoses en technique FISH a permis d'affirmer qu'il s'agit d'un gène des Ig dans 17 cas. Les hybridations complémentaires réalisées pour les besoins de ce travail ont également permis d'identifier le partenaire comme étant un gène non-Ig pour 6 patients supplémentaires.

Pour le patient n°5, le marqueur de chromosome 8 incluant le gène *MYC* est situé sur un grand chromosome pouvant correspondre à un chromosome 2 (et non à un chromosome 8 ou un 22). La sonde 2p11 encadrant le gène de la chaîne légère kappa a donc été testée.

L'absence de réarrangement du gène *IGK* a amené à conclure à la présence d'une translocation de *MYC* avec un gène non-Ig.

Concernant les patientes n°7 et n°28, le même profil est observé. Une première hybridation avec un mélange CEP8-*IGH* a d'abord permis d'exclure la t(8;14) puisqu'il n'existe qu'un seul gène *IGH* réarrangé dans chaque cellule et que celui-ci est impliqué dans la t(14;18). Le test complémentaire des sondes *IGK* et *IGL* a permis de conclure à une translocation de *MYC* avec un gène non-Ig, les 2 sondes des chaînes légères ne montrant pas de réarrangement.

Pour le patient n°8, l'observation des mitoses avec le marquage CEP8-IgH a montré que les fragments de chromosomes 14 réarrangés ne se situaient pas sur les chromosomes 8 (figure 36). Les chromosomes 2 et 22 étant normaux au caryotype, le gène impliqué dans le réarrangement avec *MYC* est donc un gène différent de ceux des Ig.

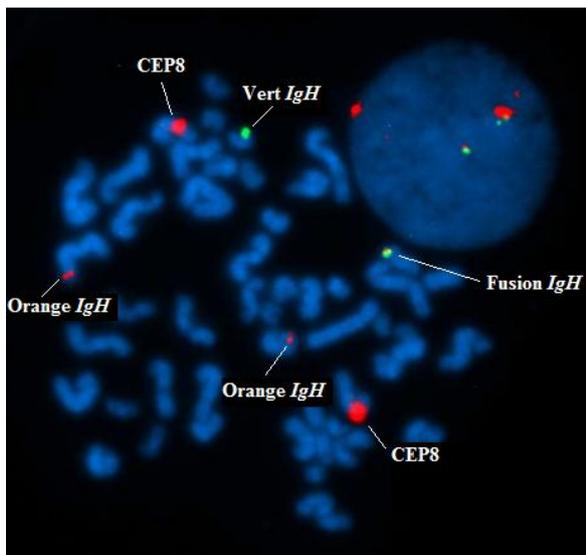


Figure 36 : Marquage CEP8-IgH (patient n°8)

Les 2 chromosomes 8 sont repérés grâce aux CEP8. Il y en plus : un IgH normal (fusion), un IgH réarrangé (1 orange + 1 vert) et un dérivé de chromosome 14 supplémentaire (1 orange).

Aucun fragment de chromosome 14 n'est situé sur un chromosome 8.

La configuration du noyau interphasique en haut à gauche semble être la même.

De même pour le patient n°11, après avoir éliminé la t(8;14) en technique FISH, c'est l'observation de chromosomes 2 et 22 au caryotype qui permet de conclure à un partenaire non-Ig.

Pour la patiente n°17, il n'y avait pas de réarrangement ni d'*IGH*, ni des chaînes légères en technique FISH.

Les hybridations effectuées pour 6 autres patients n'ont pas permis de conclure sur la nature du partenaire de *MYC*.

Par exemple, pour la patiente n°3 porteuse d'un TH, l'hybridation CEP-*IGH* a montré un réarrangement de 2 gènes *IGH* dans 45% des cellules. Bien que les gènes *IGK* et *IGL* ne soient pas transloqués, en raison de l'absence de mitose, il est impossible de conclure sur la présence d'un t(8;14). Effectivement, pour cette patiente, un gène *IGH* est impliqué dans la t(14;18) mais le deuxième peut être associé à *MYC*, à *BCL6* ou bien encore à un autre gène.

Pour le patient n°10, l'hybridation CEP8-*IGH* a permis d'exclure la t(8;14), le seul *IGH* réarrangé étant impliqué dans la t(14;18) mais malgré l'observation d'un *IGL* normal et d'un *IGK* réarrangé dans une proportion similaire à la proportion de réarrangement de *MYC*, il est impossible d'affirmer la t(2;8) en absence de mitoses observables.

De même pour le patient n°14 porteur d'un profil SH, il n'a pas été retrouvé de réarrangement *IGH* et l'analyse des chaînes légères a montré la perte d'un signal pour *IGL* et un réarrangement de *IGK* dans 76% des cellules. Malgré cette proportion de cellules réarrangées proche de la proportion déterminée pour *MYC* (82%), l'absence de mitose ne permet pas de conclure formellement à la présence d'une t(2;8).

Pour le patient n°20, malgré l'observation d'un réarrangement du gène *IGH*, l'incohérence entre le nombre de signaux observés sur les nouvelles analyses et le nombre de signaux présents au diagnostic fait suspecter un échantillon inadapté pour la suite des investigations.

Pour les 2 autres patients testés (n°2 et 22), l'envahissement très insuffisant des prélèvements congelés n'a pas permis de conclure.

Faute de matériel disponible, 7 patients n'ont pas pu faire l'objet de techniques complémentaires pour la recherche du partenaire de translocation de *MYC*.

Le retentissement des caractéristiques cytogénétiques sur la survie a été étudié en séparant les patients en différents groupes. La comparaison de répartition de l'âge au diagnostic pour les profils SH versus DH/TH ne montre pas de différence et en particulier pas de moyenne d'âge plus importante dans le groupe des réarrangements multiples DH/TH (figure 37A). En individualisant chaque type de réarrangement multiple : DH *BCL2*, DH *BCL6* et TH, la répartition des âges au diagnostic reste la même pour tous les groupes (figure 37B) et tous les profils *MYCR* sont représentés quel que soit l'âge. Contre toute attente, ce sont même les SH qui sont le moins représentés chez les patients les plus jeunes.

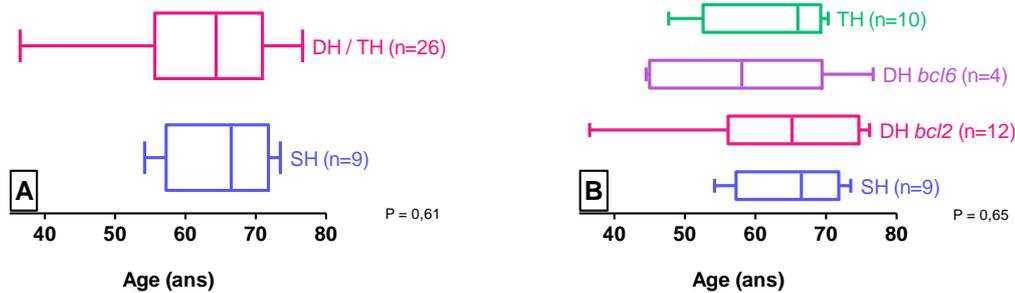


Figure 37 : Distribution des âges selon le profil MYCR SH versus DH/TH (A) et selon le profil MYCR détaillé (B)

De même, pour chacune des 2 classes d'âges précédemment définies, il n'y a pas de différence dans la répartition des profils MYCR. Les patients de moins de 65 ans comportent 4 SH, 6 DH *BCL2*, 4 DH *BCL6* et 4 TH ce qui est superposable aux patients de plus de 65 ans qui comportent 5 SH, 6 DH *BCL2*, 1 DH *BCL6* et 5 TH.

L'étude des courbes de survie en fonction des réarrangements présents ne montre pas de différence significative sur la cohorte globale (figure 38). Chaque bras : SH, DH *BCL2*, DH *BCL6* et TH comporte au moins un patient encore en vie au terme du suivi. Cependant, lorsque l'on s'intéresse aux médianes de survie, elles sont plus faibles pour les DH *BCL2* et les TH (respectivement 3,5 et 4,9 mois) que pour les SH et DH *BCL6* (respectivement 9,3 et 7,5 mois).

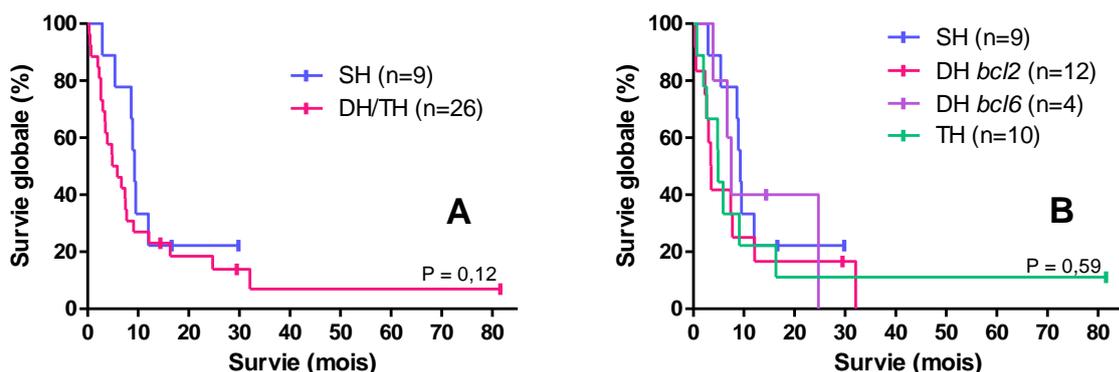


Figure 38 : Survie selon le profil MYCR SH vs DH/TH (A) et selon le profil MYCR détaillé (B)

L'individualisation des patients en groupes de traitement homogènes ne montre pas non plus de différence de survie significative entre les différents profils de réarrangement de MYC. Ceci est illustré par la figure 39 pour les patients traités par chimiothérapie associée au

rituximab et par la figure 40 pour les patients greffés. Dans le groupe des patients traités par chimiothérapie seule, hormis une médiane de survie légèrement supérieure pour les SH et les DH *BCL6* (respectivement 9 et 6,7 mois) que pour les DH *BCL2* et les TH (5,2 mois et 4,9 mois), il n'apparaît pas de différence entre les groupes. La séparation de ces groupes selon le type de traitement standard ou intensif est difficile compte tenu du faible nombre de patients (figures 39 B et C). De façon étrange, les médianes de survie sont similaires quel que soit le traitement pour les SH et les DH *BCL6* avec même un léger avantage pour le traitement intensif, alors que celles associées aux DH *BCL2* et aux TH sont moins élevées lorsqu'un traitement intensif est instauré. Cependant, compte tenu du très faible effectif présent dans chaque bras, il est difficile de conclure sur ces observations.

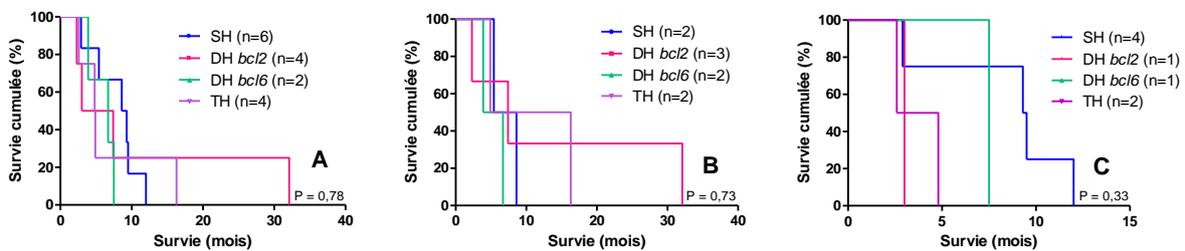


Figure 39 : Survie en fonction du profil MYCR pour des groupes de traitement homogènes. A : Toutes chimiothérapies + rituximab. B : Chimiothérapie standard + rituximab. C : Chimiothérapie intensive + rituximab.

Pour les patients greffés, l'avantage de survie semble revenir, encore une fois, aux SH et aux DH *BCL6* avec des médianes de survie respectives supérieure à 16,6 mois et égale à 24,7 mois contre 12,1 et 9,1 mois pour les DH *BCL2* et les TH (figure 40).

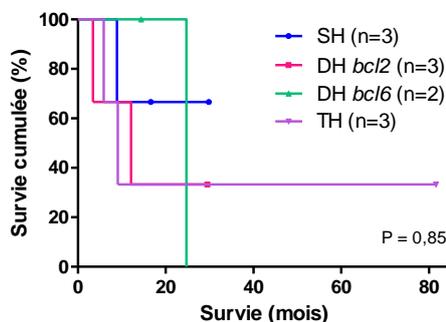


Figure 40 : Survie des patients greffés en fonction de leur profil MYCR.

Concernant l'étude des caractéristiques cliniques que sont l'envahissement méningé, l'envahissement médullaire, le nombre de localisations extra-ganglionnaires, le PS et l'IPI en

fonction du profil *MYCR*, il n'existe pas non plus de différence statistiquement significative entre les différents groupes cytogénétiques.

Néanmoins, lorsque l'on observe chacune des courbes, sauf pour l'envahissement médullaire qui est similaire dans tous les groupes, des tendances semblent exister (figures 41 et 42). Concernant l'envahissement méningé, il semble plus fréquent dans les groupe DH *BCL2*. De même, le nombre de localisations extra-ganglionnaires apparaît plus important dans ce groupe. Les TH quant à eux semblent se détacher et se rapprocher des DH *BCL2* au niveau du PS et de l'IPI. Les SH et DH *BCL6* paraissent, à chaque fois, avoir des caractéristiques cliniques similaires et moins sévères que les 2 autres groupes. Ces marqueurs d'agressivité clinique plus sévères pour les DH *BCL2* et les TH concordent avec l'observation de médianes de survie inférieures à celles des autres profils cytogénétiques.

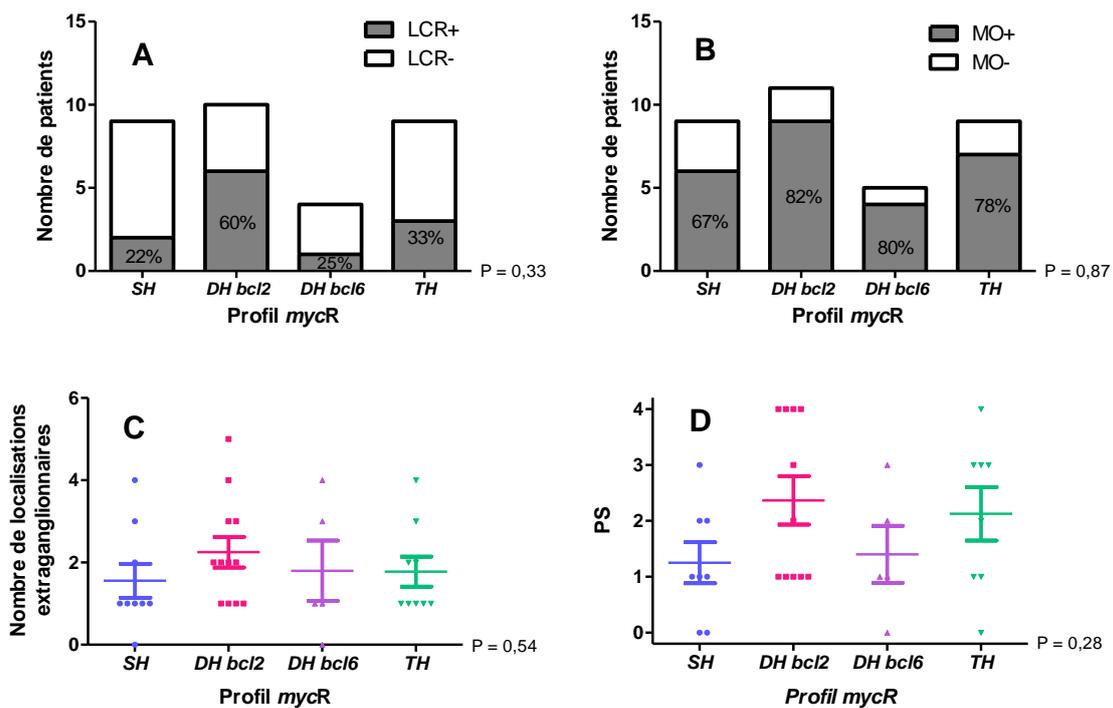


Figure 41 : Caractéristiques cliniques selon le profil *MYCR*. A : envahissement méningé, B : envahissement médullaire, C : nombre de localisations extra-ganglionnaires, D : PS.

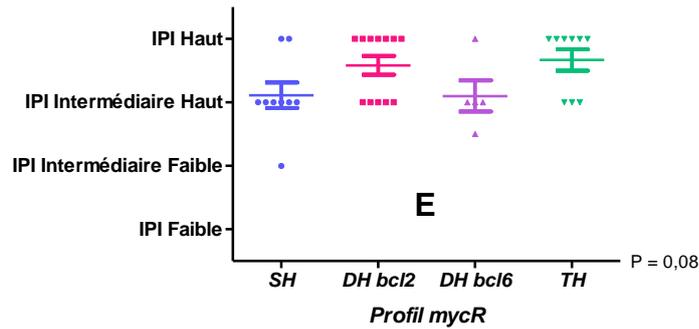


Figure 42 : IPIa selon le profil MYCR.

Le partenaire de translocation de *MYC* a été déterminé chez 23 patients et s'avère être le gène *IGH* pour 11 patients (48%), *IGK* pour un patient (4%), *IGL* pour 5 patients (22%) et un gène autre qu'un gène des Ig pour 6 cas (26%).

Lorsque l'on classe les différents types de translocations de *MYC* en fonction de l'âge des patients, il apparaît une proportion plus importante de t(8;14) chez les patients de moins de 65 ans (64% versus 33%) (figure 43). Cette diminution de la proportion de translocations classiques *MYC-IGH* chez les plus de 65 ans se fait au profit d'une augmentation de la proportion de réarrangements impliquant les gènes des chaînes légères ou un gène autre qu'un gène des Ig (33% versus 18% pour les moins de 65 ans).

	t(8;14)	t(2;8)	t(8;22)	Non Ig
< 65 ans	64%	9%	9%	18%
≥ 65 ans	33,3%	0%	33,3%	33,3%

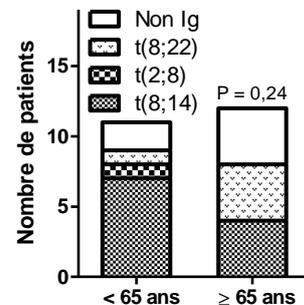


Figure 43 : Proportions de chaque type de translocation selon l'âge et représentation graphique.

Lorsque l'on compare la survie globale entre ces 4 groupes de translocation, elle n'est pas différente de façon significative (figure 44). On peut simplement noter les médianes de survie qui sont de 9,1 mois pour la t(8;14), 7,7 mois pour le seul patient ayant une t(2;8), 4,9 mois pour la t(8;22) et 5,4 mois pour les translocations *MYC-nonIG*. Cette tendance n'est pas modifiée même en séparant les SH, les DH ou les TH.

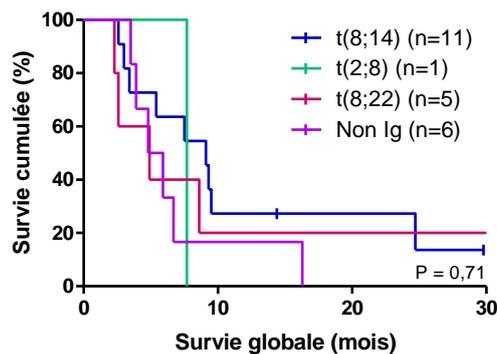


Figure 44 : Survie globale en fonction du gène partenaire de *MYC*

Quel que soit le groupe d'âge concerné, le groupe le plus favorable est celui de la t(8;14) qui affiche des médianes de survie plus élevées que les autres partenaires de *MYC*. Chez les patients de moins de 65 ans, la différence de médiane de survie est un peu plus importante lorsque l'on regroupe les partenaires de *MYC* en 2 catégories Ig versus non Ig avec des chiffres respectifs de 9,1 et 4,9 mois. Les médianes de survie de ce groupe pour les catégories IgH versus non IgH sont de 9,1 et 6,8 mois. Quant aux patients de plus de 65 ans, ils n'ont pas de médiane de survie différente si on les sépare selon le type de translocation Ig et non Ig (5,2 versus 5,8 mois). La différence est un peu plus marquée entre *IGH* versus non *IGH* avec des médianes de survie de 7,4 versus 4,9 mois.

De même que pour la survie, les réarrangements associés à celui de *MYC* et la nature de son partenaire de translocation n'ont pas d'impact significatif sur le taux de rémission complète (P = 0,91 pour la comparaison selon le profil SH, DH et TH, P = 0,56 pour la comparaison selon le partenaire impliqué dans la translocation).

Si l'on s'intéresse à la nature du partenaire de translocation de *MYC* en fonction du profil SH, DH *BCL2/BCL6* ou TH, il ne ressort pas de différence majeure. Les seuls faits remarquables sont l'absence de partenaire non Ig dans le groupe des SH et la plus grande fréquence de partenaires autres qu'IgH dans le groupe des TH. Le partenaire de *MYC* ne permet cependant pas d'expliquer la sévérité des DH *BCL2* comparés aux SH et DH *BCL6* (figure 45).

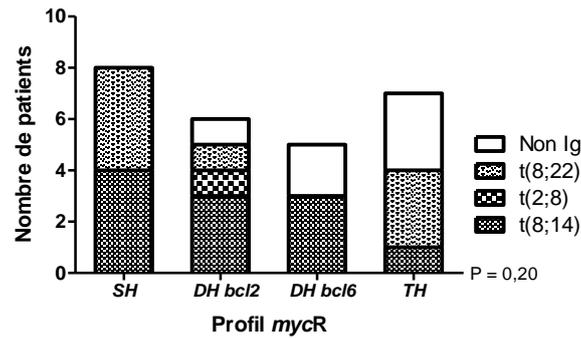


Figure 45 : Partenaire de *MYC* en fonction du profil SH, DH ou TH

L'analyse de la survie en fonction du partenaire de *MYC* selon des groupes de traitement homogènes n'est pas réalisable en raison du trop faible effectif de la population.

Les données d'IHC ont également été comparées au profil cytogénétique. Ainsi, l'hyperexpression de *BCL2* apparaît, de façon logique, bien plus fréquente lorsqu'il existe une translocation du gène (dans les DH *BCL2* et les TH), mais existe également en absence de réarrangement évident de *BCL2* (figure 46A). Cependant, la courbe de survie en fonction de l'expression de *BCL2* et en absence de réarrangement de son gène ne montre aucune différence entre les patients exprimant fortement *BCL2* et ceux ne l'exprimant pas (figure 46B). Ceci est en faveur d'un mauvais pronostic associé à la translocation du gène et n'existant pas avec les autres mécanismes d'hyperexpression de *BCL2*.

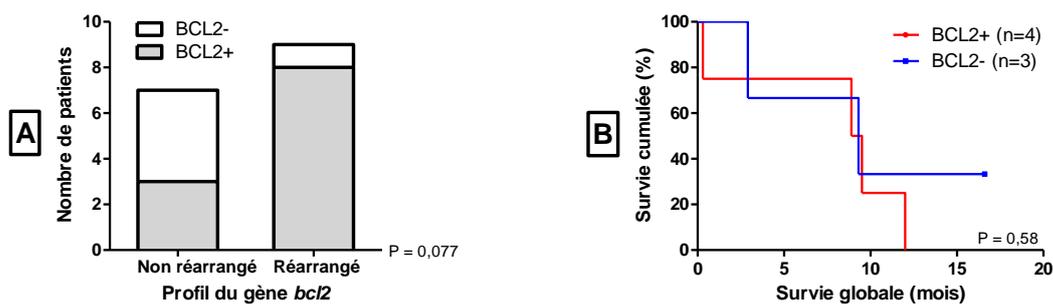


Figure 46. A : Expression de *BCL2* en IHC en fonction de la présence ou non d'un réarrangement de son gène. B : Survie globale en fonction l'expression de *BCL2* en absence de réarrangement du gène.

La positivité de *BCL2* en IHC en fonction du partenaire de translocation de *MYC* est analysable pour 8 patients. Aucune tendance ne semble ressortir, *BCL2* est positif pour un patient ayant une t(8;14), 2 ayant une t(8;22) et 3 ayant une translocation de *MYC* avec un gène non Ig. Ce marqueur est négatif pour 2 patients ayant une t(8;14).

L'expression de MiB1 et c-myc n'est pas différente en fonction du profil SH, DH ou TH. Chacun de ces profil est associé à un index de prolifération élevé et à une positivité de c-myc variable.

Les comparaison entre la positivité de MiB1 et le partenaire de translocation de *MYC* n'est possible que pour 7 patients. Les partenaires concernés sont variés : une t(8;14), 3 t(8;22) et 3 gènes non-Ig. Aucune différence d'intensité de MiB1 n'est décelable pour ces patients, ils affichent tous un index de prolifération élevé.

L'analyse de la nature du partenaire de *MYC* en fonction de l'intensité de c-myc en IHC n'est disponible que pour 5 patients. Là encore, aucune différence ne ressort. La positivité de c-myc est forte pour un patient porteur d'une t(8;14) et 2 patients porteurs d'une t(8;22). Les pourcentages les plus faibles correspondent à une autre t(8;14) et à une translocation avec un gène non Ig.

5.5.Immunophénotypage

L'immunophénotypage a été effectué et est interprétable pour 26 des patients. Les résultats disponibles par patient et par marqueur sont en annexe 8.

La population ciblée est donc une population lymphocytaire mature CD45 fort et CD19 positif. Dans un contexte de DLBCL, l'expression de CD19 est connue pour être fréquemment diminuée par rapport aux lymphocytes normaux. Ceci a été vérifié dans ce travail.

CD5 est généralement absent, seuls 4 patients soit 15% des cas expriment fortement CD5. L'expression de CD10 est variable : parmi les 23 patients pour lesquels ce marqueur est disponible, il est positif dans environ 60% des cas dont 2 patients (9%) pour lesquels il est partiel. Ce pourcentage de patients positifs pour CD10 est plus important que la moyenne des LNH dans lesquels cette caractéristique n'est retrouvée que dans 17% des cas environ.

L'expression de CD20 est le plus souvent diminuée dans cette cohorte (RFI intermédiaire pour 68% des patients) et même absente pour 2 patients (8% des cas). A noter que ce marqueur est partiel pour 5 patients. CD22 est positif dans tous les cas sauf un, le plus souvent intermédiaire (17 patients), parfois fort (6 patients) et partiel pour un des patients. CD23 est presque toujours absent (90% des cas), sauf pour 2 patients pour lesquels il est très faible.

L'expression de CD79b est négative pour un patient, intermédiaire pour 10 d'entre eux et forte pour les 14 autres (56% des patients). La présence de Fmc7 est très variable également : ce marqueur est absent, faible ou fort respectivement pour 5 (25%), 9 (45%) et 6 patients (30%).

Les sIg ont des MFI fortes pour 14 patients sur 26 (54%), elles sont faibles pour 10 autres (38%) et même négatives pour 3 patients.

CD38 est toujours présent, et même fortement le plus souvent (60% des cas).

Enfin, pour CD81 et CD43, dont la recherche a été introduite dans le panel en 2009, on trouve une expression de CD81 constamment forte pour les 8 patients testés et celle de CD43 est a priori très variable sur les 5 patients testés (3 forts, 1 faible et 1 négatif).

Il est intéressant de confronter la positivité de différents marqueurs avec le type de profil *MYCR* en cytogénétique.

Il n'existe aucune différence d'intensité entre SH et DH/TH pour CD5, CD10, CD22, CD23, Fmc7, CD38, CD81 et CD43.

Concernant CD20, tous les patients pour lesquels l'expression de ce marqueur est partielle sont des DH ou TH. De plus, lorsque l'on compare la répartition des RFI selon le profil SH ou DH/TH, tous les patients DH et TH sauf un sont CD20 négatif ou faible, contrairement aux SH pour lesquels CD20 est beaucoup plus fort (figure 47). Pour rappel, le seuil entre CD20 intermédiaire et fort est fixé pour une RFI de 90.

La même observation est faite pour CD79b qui est le plus souvent intermédiaire dans le groupe des DH/TH et fort dans celui des SH (figure 47). Pour ce marqueur, le seuil entre RFI intermédiaire et forte est fixé à 20.

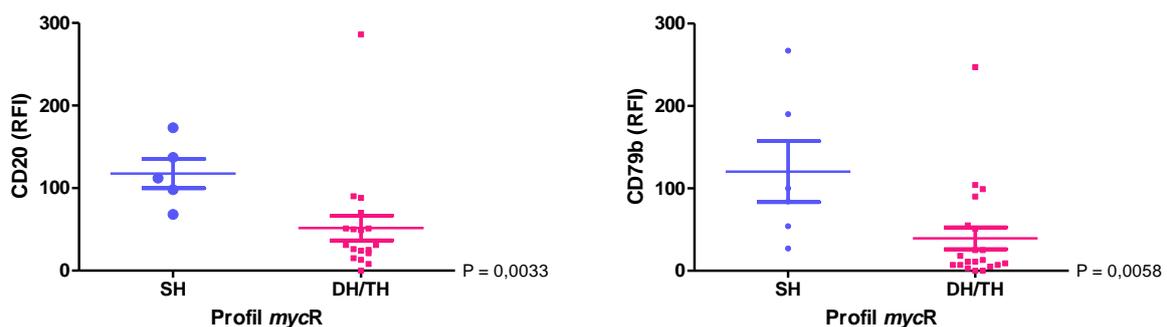


Figure 47 : Répartition des RFI de CD20 et de CD79b en fonction du profil *MYCR*

Les sIg affichent le plus souvent une clonalité de type kappa (16 patients kappa pour 8 lambda). Compte tenu du faible effectif, il n'apparaît pas de différence significative de MFI selon le profil *MYCR*. Cependant, les 3 patients ayant des Ig de surface négatives sont des DH et on retrouve des sIg faibles chez 9 patients sur 17 dans le groupe des DH/TH versus 1 sur 5

seulement dans le groupe des SH. Les sIg semblent donc plus faibles dans les cas de DH et TH (figure 48).

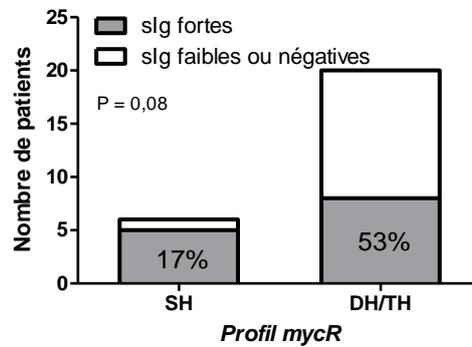


Figure 48 : Interprétation des sIg en CMF en fonction du profil MYCR

La comparaison des différents marqueurs en isolant les sous-types DH *BCL2*, DH *BCL6* et TH ne fait apparaître aucune différence entre eux.

Le profil en CMF des DLBCL *MYCR* de cette cohorte correspond aux quelques observations publiées dans la bibliographie : CD45⁺, CD19⁺ ou dim, CD22⁺, CD23⁻ et CD38 fort. Sont retrouvées en plus d'autres caractéristiques récurrentes : un CD81 fort quel que soit le profil *MYCR* et, dans le cas des DH et TH uniquement : CD20 diminué, sIg faibles et CD79b diminué. Les phénotypes de 2 patients, un SH et un DH, sont insérés en annexes 9 et 10.

6. Discussion

6. Discussion

Ce travail a permis de caractériser 36 patients atteints de DLBCL de novo avec réarrangement de *MYC* à la fois sur le plan clinique, morphologique, phénotypique et cytogénétique.

Il en ressort la mise en évidence, comme décrit dans la littérature, d'une pathologie hautement agressive avec une médiane de survie de 5,9 mois et des chiffres de survie globale à un an et deux ans de 28% et 14%. Cependant, il existe naturellement un biais de recrutement dans cette cohorte puisque c'est l'agressivité clinique initiale de la pathologie qui a fait suspecter la présence d'un réarrangement de *MYC* et amené à sa recherche.

De plus, la prise en charge tardive de ces patients ne permet que rarement leur inclusion dans des protocoles cliniques et entraîne une sous-estimation de cette population. Des études de cohortes non sélectionnées de DLBCL pourraient donc être plus adaptées pour comprendre l'impact réel d'un réarrangement de *MYC*.

Les caractéristiques cliniques reflètent également cette agressivité avec une dissémination extra-ganglionnaire, médullaire et/ou méningée fréquente, un taux de LDH supérieur à la normale dans la quasi-totalité des cas, un stade clinique et un IPI élevés. Aucun de ces facteurs isolés ou associés dans le calcul de l'IPI n'est prédictif du devenir des patients, même en séparant les différents profils SH, DH et TH. En revanche, un âge supérieur à 65 ans est associé de manière significative à un plus mauvais pronostic.

Les données cytogénétiques sont compatibles avec celles de la bibliographie avec la présence de doubles ou triples translocations dans 72% des cas de cette cohorte de DLBCL *MYCR* de novo et l'association permanente à un caryotype complexe. Comme dans les séries publiées, le profil le plus fréquent est DH *BCL2* puis les TH et enfin les DH *BCL6*. L'âge moyen des patients inclus est de 63,1 ans et bien qu'il existe dans cette série quelques patients de moins de 50 ans, l'incidence des DLBCL *MYCR* semble augmenter avec l'âge. En revanche, l'apparition des translocation associées à *MYC* ne semble pas liée à l'âge et contre toute attente, l'âge médian le plus élevé est celui des SH.

Il semble exister une tendance à un plus mauvais pronostic pour les DH *BCL2* et les TH et cette survie inférieure apparaît liée à des caractéristiques cliniques plus sévères dans ces 2 groupes.

Le partenaire de *MYC* est un gène des Ig dans 74% des cas et il s'agit alors le plus souvent de gène *IGH* puis *IGL* et enfin *IGK*. Les partenaires de *MYC* autres que *IGH* ne sont retrouvés dans cette série que dans les DH et TH. La corrélation entre partenaire de *MYC* et survie dégage une tendance (non significative) à un survie légèrement supérieure lorsque le partenaire de *MYC* est un gène des Ig, et notamment *IGH*. Ceci n'est pas dû à un biais lié à l'âge bien que la fréquence de translocations avec des gènes autres que *IGH* soit plus importante chez les patients de plus de 65 ans. En effet, même dans ce groupe d'âge, les médianes de survie sont plus importantes lorsque *MYC* est impliqué dans une t(8;14). Cette observation de devenir plus favorable lorsque le partenaire de *MYC* est un gène des Ig est en accord avec la répartition de ces gènes partenaires en fonction du profil SH, DH ou TH et de la sévérité plus importante observée dans les cas de DH et TH comparés aux SH.

En revanche, ces observations s'opposent aux quelques cas publiés dans la littérature, peut-être à cause d'une sous-estimation du nombre de cas de réarrangements *MYC-non IG*.

Le phénotype de ces DLBCL *MYCR* est presque exclusivement de type GC et il ne semble pas exister de différence de pronostic entre GC et non-GC dans cette cohorte. Le bon pronostic habituellement lié au type GC est annulé par la présence des anomalies génétiques. Cette pathologie est hautement proliférante, comme le montre l'index de prolifération toujours supérieur à 50% et même très élevé pour 13 des 16 patients pour lesquels il est disponible. L'expression de *BCL2* est forte dans de nombreux cas, il existe une corrélation avec la présence du réarrangement de son gène mais il existe également dans cette série de cas quelques patients pour lesquels, bien qu'aucune translocation n'ait été mise en évidence, l'expression de *BCL2* est très élevée. Ces patients représentent 43% des patients ayant un gène *BCL2* non réarrangé et 19% des DLBCL *MYCR* pour lesquels l'immunomarquage de *BCL2* est disponible. Cependant, le mauvais pronostic lié à *BCL2* ne semble exister qu'en présence d'une translocation de son gène puisque cette tendance n'existe plus lorsque sont exclus les patients présentant un réarrangement de *BCL2*.

Il n'existe pas, dans cette cohorte, de lien entre le profil SH ou DH/TH ou entre le partenaire de translocation de *MYC* et la positivité des marqueurs associés à un mauvais pronostic tels que *BCL2*, *Ki67* ou *c-myc*.

L'expression de *c-myc* est positive pour tous les patients pour lesquels le marquage a pu être réalisé, néanmoins elle reste assez faible pour 25% des patients testés pourtant tous porteurs d'un réarrangement du gène. Il faudrait comparer cette positivité de *c-myc* avec un marquage sur des prélèvements de DLBCL non-*MYC*R pour juger de l'intérêt de cet anticorps dans la détection des réarrangements et pour juger de sa valeur pronostique.

L'immunophénotypage est assez remarquable dans ces DLBCL *MYC*R. Ils ont généralement en commun un profil CD45 fort, CD19+, CD10+, CD5-, CD22+, CD23-, CD38 fort, CD81 fort. Les DH et TH sont fréquemment, à la différence des SH, CD20, CD79b et sIg plus faibles, voire partiels ou négatifs. Cette anomalie portant sur CD79b n'a encore jamais été décrite dans la littérature. L'association de ces caractéristiques doit faire évoquer la possibilité d'un DLBCL DH ou TH.

La réponse au traitement est difficile à obtenir, avec une rémission le plus souvent partielle et transitoire atteinte dans un peu plus de 60% des cas seulement. La résistance à la chimiothérapie, quelle qu'elle soit, est classique dans cette pathologie ainsi que les rechutes fréquentes.

Néanmoins, malgré les affirmations de certaines publications et bien que l'effectif de la cohorte soit assez petit, il ressort un impact favorable significatif de l'association de rituximab au traitement ainsi que de la greffe de CSH. Il est difficile en revanche de conclure à un bénéfice du traitement intensif, qui ne semble pas plus efficace que les traitements standards notamment chez les patients de plus de 65 ans et dans les cas de DH *BCL2* et TH.

D'autres marqueurs potentiellement prédictifs de la survie ont été imaginés, notamment STAT3, ID3 et CSE1L. STAT3 est un facteur de transcription dont l'activité est augmentée dans les DLBCL de type non-GC. ID3 quant à lui est un inhibiteur de la liaison à l'ADN des facteurs de transcription impliqué dans le contrôle de la prolifération, de la survie et de la différenciation cellulaire. Son expression élevée dans les tumeurs solides entraîne une résistance à l'apoptose induite par la chimiothérapie. Enfin, CSE1L intervient dans le transport nucléaire de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, notamment des oncogènes et

des gènes suppresseurs de tumeurs. Son expression est augmentée dans un certain nombre de carcinomes et dans les LNH de haut grade. ID3 et CSE1L seraient plus fréquemment associés au BL et à des survies supérieures. Au contraire, STAT3 est plus souvent élevé dans les DLBCL et plus particulièrement ceux de type non-GC. L'équipe de Soldini propose un algorithme diagnostique assez simple pour définir un profil plutôt de type BL ou de type DLBCL corrélé à la survie en fonction de la positivité de STAT3 et CSE1L en IHC ainsi que de la présence de réarrangement de *MYC* en FISH (87). Cette classification des lymphomes de haut grade montre un intérêt à la prescription d'un traitement intensif pour les DLBCL de type BL selon l'algorithme.

Face à la difficulté pour individualiser des facteurs prédictifs de survie dans les DLBCL *MYCR*, la mise au point de nouveaux protocoles thérapeutiques est également un enjeu majeur. De nombreuses études comparent différents types de chimiothérapies intensives, sans succès (16)(31)(41)(57).

Au stade expérimental, des essais d'inhibition de l'expression de *c-myc* chez l'animal via différentes stratégies semblent prometteurs (20). Ces stratégies ont pu permettre une régression tumorale, une différenciation des cellules lymphomateuses en cellules matures et parfois, lors de la réactivation de *c-myc*, une absence de nouvelle progression tumorale avec au contraire une élimination des cellules exprimant *c-myc* par apoptose. Dans d'autres études, un nouveau développement tumoral est apparu à l'arrêt de l'intervention thérapeutique.

ID3 et STAT3 sont également des cibles thérapeutiques potentielles. Les inhibiteurs du protéasome tels que le bortezomib pourraient également s'avérer intéressants dans les DLBCL de type ABC afin d'inhiber la destruction de protéines inactivatrices de la voie NF- κ B (88).

7. Conclusion

7. Conclusion

Le mauvais pronostic et l'agressivité clinique associés aux DLBCL avec réarrangement de *MYC* ne sont plus à prouver, cette étude le démontre une fois de plus. Il est, pour cette raison, important de bien caractériser ces lymphomes autant cliniquement que sur les plans morphologique et phénotypique afin d'instaurer au plus vite un traitement adapté.

En revanche, il subsiste un doute quant à l'impact additionnel des secondes et troisièmes translocations. Bien qu'incluant un faible effectif de patients et de ce fait la significativité statistique n'étant pas atteinte, il semble que les DH *BCL2* et les TH soient encore plus défavorables que les SH et les DH *BCL6* à la fois sur le plan de la survie et de l'agressivité clinique.

Les autres facteurs impactant la survie sont l'addition du rituximab au traitement et la réalisation d'une greffe de CSH.

La proposition de certains auteurs d'individualiser une catégorie de lymphomes avec hyperexpression de *c-myc* et de *BCL2* est encore à débattre. L'impact pronostique de l'expression de *c-myc* n'est pas évaluable dans cette étude mais celle de *BCL2* en dehors de toute translocation de son gène ne semble pas prédictive d'une survie inférieure.

Cette entité des lymphomes *MYCR* nécessite d'être étudiée précisément et caractérisée sur de plus larges cohortes afin de définir de nouveaux marqueurs pronostiques et d'améliorer la prise en charge thérapeutique.

Références bibliographiques

1. Le Gouill S, Talmant P, Touzeau C, Moreau A, Garand R, Juge-Morineau N, et al. The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement. *Haematologica*. oct 2007;92(10):1335-1342.
2. Collège des enseignants d'immunologie. *Immunologie fondamentale et immunopathologie*. Elsevier Masson. 2013.
3. Femand JP, Amé-Thomas P, Amulf B, Delfau Larue MH, Frenkel V, Vallat L. Mécanismes physiopathologiques des anomalies de la prolifération lymphocytaire, notion de clonalité/prolifération clonale.
4. Molina T. Physiopathologie des lymphomes diffus à grandes cellules B. *Hématologie* 2009.
5. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 22 nov 2011;105(11):1684-1692.
6. Swerdlow S. World Health Organization classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon : IARC Press; 2008.
7. Benattar L, Flandrin G. Nouvelles approches diagnostiques des lymphomes malins B. *Ann Biol Clin (Paris)*. 61(5):513-519.
8. Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd H-W, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2 déc 2010;116(23):4916-4925.
9. Jaffe ES, Pittaluga S. Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:506-514.
10. Delsol G. Les anomalies moléculaires dans les lymphomes. *Bull Cancer (Paris)*. 97(11):1347-1364.
11. Munoz J, Vekaria M, Hanbali A, Janakiraman N. Progression of double-hit lymphoma in the midst of R-hyper CVAD. *Am J Hematol*. janv 2013;88(1):87-88.
12. Cuenca X, Xhaard A, Mounier N. [Prognostic factors in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas]. *Bull Cancer (Paris)*. avr 2009;96(4):461-473.
13. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 3 janv 2007;109(5):1857-1861.

14. Dunleavy K, Grant C, Wilson WH. Using biologic predictive factors to direct therapy of diffuse large B-cell lymphoma. *Ther Adv Hematol.* févr 2013;4(1):43-57.
15. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood.* 16 mai 2013;121(20):4021-4031; quiz 4250.
16. Cuccuini W, Briere J, Mounier N, Voelker H-U, Rosenwald A, Sundstrom C, et al. MYC+ diffuse large B-cell lymphoma is not salvaged by classical R-ICE or R-DHAP followed by BEAM plus autologous stem cell transplantation. *Blood.* 17 mai 2012;119(20):4619-4624.
17. Barrans SL, O'Connor SJM, Evans PAS, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, 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.* mai 2002;117(2):322-332.
18. Kojima M, Nishikii H, Takizawa J, Aoki S, Noguchi M, Chiba S, et al. MYC rearrangements are useful for predicting outcomes following rituximab and chemotherapy: multicenter analysis of Japanese patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 8 mars 2013;
19. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TFE, Bernd H-W, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 21 mars 2013;121(12):2253-2263.
20. Alderton GK. Therapy: Modifying MYC expression. *Nat Rev Cancer.* sept 2011;11(9):626-627.
21. Smith SM, Anastasi J, Cohen KS, Godley LA. The impact of MYC expression in lymphoma biology: beyond Burkitt lymphoma. *Blood Cells Mol Dis.* 15 déc 2010;45(4):317-323.
22. Slack GW, Gascoyne RD. MYC and aggressive B-cell lymphomas. *Adv Anat Pathol.* mai 2011;18(3):219-228.
23. Lenze D, Leoncini L, Hummel M, Volinia S, Liu CG, Amato T, et al. The different epidemiologic subtypes of Burkitt lymphoma share a homogenous micro RNA profile distinct from diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia.* déc 2011;25(12):1869-1876.
24. Janz S. Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasms. *DNA Repair.* 8 sept 2006;5(9-10):1213-1224.
25. Durot E, Patey M, Luquet I, Gaillard B, Kolb B, Delmer A. An aggressive B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and CCND1 genes: a rare subtype of double-hit lymphoma. *Leuk Lymphoma.* mars 2013;54(3):649-652.
26. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology [Internet]. [cité 21 août 2013]. Disponible sur: <http://atlasgeneticsoncology.org/GeneticFr.html>

27. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 juill 2010;28(20):3360-3365.
28. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 oct 2012;30(28):3460-3467.
29. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 22 oct 2009;114(17):3533-3537.
30. Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*. 28 mai 2013;
31. Carbone A, Gloghini A, Aiello A, Testi A, Cabras A. B-cell lymphomas with features intermediate between distinct pathologic entities. From pathogenesis to pathology. *Hum Pathol*. mai 2010;41(5):621-631.
32. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*. déc 2008;8(12):976-990.
33. Mossafa H, Damotte D, Jenabian A, Delarue R, Vincenneau A, Amouroux I, et al. Les lymphomes malins non hodgkiniens avec amplification de c-MYC ont un mauvais pronostic. *Hématologie*. 13(6):465-470.
34. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Neriah S, Woods R, Steidl C, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood*. 10 sept 2009;114(11):2273-2279.
35. Barrans SL, Evans PAS, O'Connor SJM, Kendall SJ, Owen RG, Haynes AP, et al. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. juin 2003;9(6):2133-2139.
36. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, 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*. févr 2013;98(2):255-263.
37. Salles G. Lymphomas biology. *Hématologie*. juin 2007;13(3):141-4.
38. Basso K, Dalla-Favera R. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev*. mai 2012;247(1):172-183.

39. Sébahoun G. *Hématologie clinique et biologique*. Wolters Kluwer France; 2005.
40. Akasaka T, Ueda C, Kurata M, Akasaka H, Yamabe H, Uchiyama T, et al. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. *Blood*. 15 oct 2000;96(8):2907-2909.
41. Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer*. 1 sept 2012;118(17):4173-4183.
42. Haioun C, Bosly A, Coiffier B, Reyes F. Lymphomes agressifs : stratégies thérapeutiques. *Médecine Thérapeutique*. 22 juin 2000;6(5):360-5.
43. al. Prise en charge du lymphome B diffus à grandes cellules en 2012. *Rev Médicale Suisse*. 29 août 2012;351(29):1582-1590.
44. Bouabdallah K, Milpied N. Actualités sur les lymphomes malins non hodgkiniens. *Bull Cancer (Paris)*. 1 janv 2007;94(1):43-52.
45. Bonnet C, De Prijck B, Lejeune M. Prise en charge du lymphomes B diffus à grandes cellules en 2012. août 2012;
46. Pedersen MØ, Gang AO, Poulsen TS, Knudsen H, Lauritzen AF, Nielsen SL, et al. Double-hit BCL2/MYC translocations in a consecutive cohort of patients with large B-cell lymphoma - a single centre's experience. *Eur J Haematol*. juill 2012;89(1):63-71.
47. Lindsley RC, LaCasce AS. Biology of double-hit B-cell lymphomas. *Curr Opin Hematol*. juill 2012;19(4):299-304.
48. Pillai RK, Sathanoori M, Van Oss SB, Swerdlow SH. Double-hit B-cell lymphomas with BCL6 and MYC translocations are aggressive, frequently extranodal lymphomas distinct from BCL2 double-hit B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. mars 2013;37(3):323-332.
49. Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, Takeuchi K, Koike J, Motomura S, et al. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations. *Haematologica*. juill 2009;94(7):935-943.
50. Benz R, Tchinda J. Double hit, triple hit—look for it. *Blood*. 28 mars 2013;121(13):2383-2383.
51. Nanua S, Bartlett NL, Hassan A, Robirds D, Branson J, Frater JL, et al. Composite diffuse large B-cell lymphoma and precursor B lymphoblastic lymphoma presenting as a double-hit lymphoma with MYC and BCL2 translocation. *J Clin Pathol*. 11 janv 2011;64(11):1032-1034.
52. Snuderl M, Kolman OK, Chen Y-B, Hsu JJ, Ackerman AM, Dal Cin P, 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*. mars 2010;34(3):327-340.

53. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma E-J, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 24 févr 2011;117(8):2319-2331.
54. Kobayashi T, Tsutsumi Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Yamamoto-Sugitani M, Shimura Y, et al. Double-hit lymphomas constitute a highly aggressive subgroup in diffuse large B-cell lymphomas in the era of rituximab. *Jpn J Clin Oncol*. nov 2012;42(11):1035-1042.
55. Friedberg JW. Double-hit diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 oct 2012;30(28):3439-3443.
56. Sun G, Montella L, Yang M. MYC Gene FISH Testing in Aggressive B-Cell Lymphomas: Atypical Rearrangements May Result in Underreporting of Positive Cases. *ASH Annu Meet Abstr*. 16 nov 2012;120(21):1552.
57. Lin P, Dickason TJ, Fayad LE, Lennon PA, Hu P, Garcia M, et al. Prognostic value of MYC rearrangement in cases of B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Cancer*. 15 mars 2012;118(6):1566-1573.
58. Bürgesser MV, Gualco G, Diller A, Natkunam Y, Bacchi CE. Clinicopathological features of aggressive B-cell lymphomas including B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell and Burkitt lymphomas: a study of 44 patients from Argentina. *Ann Diagn Pathol*. juin 2013;17(3):250-255.
59. Li S, Lin P, Fayad LE, Lennon PA, Miranda RN, Yin CC, et al. B-cell lymphomas with MYC/8q24 rearrangements and IGH@BCL2/t(14;18)(q32;q21): an aggressive disease with heterogeneous histology, germinal center B-cell immunophenotype and poor outcome. *Mod Pathol Off J United States Can Acad Pathol Inc*. janv 2012;25(1):145-156.
60. Mationg-Kalaw E, Tan LHC, Tay K, Lim ST, Tang T, Lee YYL, et al. Does the proliferation fraction help identify mature B cell lymphomas with double- and triple-hit translocations? *Histopathology*. déc 2012;61(6):1214-1218.
61. Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, Roy A, Dal Cin P, Neuberg DS, et al. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PLoS One*. 2012;7(4):e33813.
62. Da Cunha Santos G, Ko HM, Saieg MA, Boerner SL, Lai SW, Bailey D, et al. Cytomorphologic findings of B-cell lymphomas with concurrent IGH/BCL2 and MYC rearrangements (dual-translocation lymphomas). *Cancer Cytopathol*. 25 août 2011;119(4):254-262.
63. Kanagal-Shamanna R, Medeiros LJ, Lu G, Wang SA, Manning JT, Lin P, et al. High-grade B cell lymphoma, unclassifiable, with blastoid features: an unusual morphological subgroup associated frequently with BCL2 and/or MYC gene rearrangements and a poor prognosis. *Histopathology*. nov 2012;61(5):945-954.
64. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. 15 nov 2004;104(10):3009-3020.

65. Schniederjan SD, Li S, Saxe DF, Lechowicz MJ, Lee KL, Terry PD, et al. A novel flow cytometric antibody panel for distinguishing Burkitt lymphoma from CD10+ diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* mai 2010;133(5):718-726.
66. Wu D, Wood BL, Dorer R, Fromm JR. « Double-Hit » mature B-cell lymphomas show a common immunophenotype by flow cytometry that includes decreased CD20 expression. *Am J Clin Pathol.* août 2010;134(2):258-265.
67. Grier DD, Montoya K, Pang C. Case study interpretation—Portland: Case 3. *Cytometry B Clin Cytom.* 2012;82B(3):183-5.
68. Platt MY, DeLelys ME, Preffer FI, Sohani AR. Flow cytometry is of limited utility in the early identification of « double-hit » B-cell lymphomas. *Cytometry B Clin Cytom.* mai 2013;84(3):143-148.
69. Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, Leach S, Brooks-Wilson A, Sehn LH, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood.* 16 avr 2009;113(16):3773-3780.
70. Harrington AM, Olteanu H, Kroft SH, Esho C. The unique immunophenotype of double-hit lymphomas. *Am J Clin Pathol.* avr 2011;135(4):649-650.
71. Salaverria I, Siebert R. The gray zone between Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma from a genetics perspective. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 mai 2011;29(14):1835-1843.
72. Tanaka H, Hashimoto S, Abe D, Sakai S, Takagi T. Double-hit lymphoma at second relapse of Burkitt-like lymphoma: a case report. *J Clin Exp Hematop JCEH.* 2011;51(1):43-47.
73. Setoodeh R, Schwartz S, Papenhausen P, Zhang L, Sagatys EM, Moscinski LC, et al. Double-hit mantle cell lymphoma with MYC gene rearrangement or amplification: a report of four cases and review of the literature. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(2):155-167.
74. Abramson JS, Barnes JA, Feng Y, Takvorian T, Neuberg DS, Hochberg EP, et al. Double Hit Lymphomas: Evaluation of Prognostic Factors and Impact of Therapy. *ASH Annu Meet Abstr.* 16 nov 2012;120(21):1619.
75. Cook JR, Goldman BH, Tubbs RR, LeBlanc M, Rimsza LM, Stiff P, et al. MYC Protein Expression, but Not High Grade Morphology, Is Associated with Poor Outcome in Non-Burkitt Diffuse Aggressive B-Cell Lymphomas: A SWOG S9704 Correlative Study. *ASH Annu Meet Abstr.* 16 nov 2012;120(21):543.
76. Katsura Y, Ohta I, Yoshida C, Ohtani H, Komeno T. Diffuse large B-cell lymphoma carrying both t(3 ; 7)(q27 ; p12) and t(8 ; 14)(q24 ; q32). *Intern Med Tokyo Jpn.* 2011;50(8):905-908.
77. Schiefer A-I, Melcher M, Bago-Horvath Z, Eder S, Skrabs C, Hauswirth A, et al. A New Prognostic Score for Aggressive B-Cell Lymphoma with C-MYC Translocation Integrating Clinical and Genetic Features. *ASH Annu Meet Abstr.* 16 nov 2012;120(21):2685.

78. Copie-Bergman C, Cuilliere-Dartigues P, Baia M, Briere J, Canioni D, Parrens M, et al. MYC Gene Simple Hit Is a Strong Independent Predictive Factor of Survival in Diffuse Large B-Cell Lymphomas in Contrast to MYC Double-Hit Gene Alterations: A Study by the Groupe d'Etude Des Lymphomes De l'Adulte. *ASH Annu Meet Abstr.* 16 nov 2012;120(21):541.
79. Perry AM, Crockett D, Dave BJ, Althof P, Winkler L, Smith LM, et al. B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and burkitt lymphoma: study of 39 cases. *Br J Haematol.* juill 2013;162(1):40-49.
80. Pedersen MO, Gang AO, Poulsen TS, Knudsen H, Lauritzen AMF, Nielsen SL, et al. MYC Translocation Partner Gene Determines Survival in Large B-Cell Lymphoma with MYC- or Double Hit MYC/BCL2 Translocation. *ASH Annu Meet Abstr.* 16 nov 2012;120(21):542.
81. Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, Briere J, Baia M, Jais J-P, 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 Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 nov 2009;27(33):5573-5579.
82. Testoni M, Kwee I, Greiner TC, Montes-Moreno S, Vose J, Chan WC, et al. Gains of MYC locus and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Br J Haematol.* 2011;155(2):274-7.
83. Foot NJ, Dunn RG, Geoghegan H, Wilkins BS, Neat MJ. Fluorescence in situ hybridisation analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections in the diagnostic work-up of non-Burkitt high grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a single centre's experience. *J Clin Pathol.* sept 2011;64(9):802-808.
84. Thieblemont C, Brière J. MYC, BCL2, BCL6 in DLBCL: impact for clinics in the future? *Blood.* 21 mars 2013;121(12):2165-2166.
85. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer.* 22 nov 2011;105(11):1684-1692.
86. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 oct 2012;30(28):3452-3459.
87. Soldini D, Montagna C, Schüffler P, Martin V, Georgis A, Thiesler T, et al. A new diagnostic algorithm for Burkitt and diffuse large B-cell lymphomas based on the expression of CSE1L and STAT3 and on MYC rearrangement predicts outcome. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* janv 2013;24(1):193-201.
88. Cabanillas F. New developments in the field of diffuse large cell lymphoma. *Hematol Amst Neth.* avr 2012;17 Suppl 1:S98-100.

Annexes

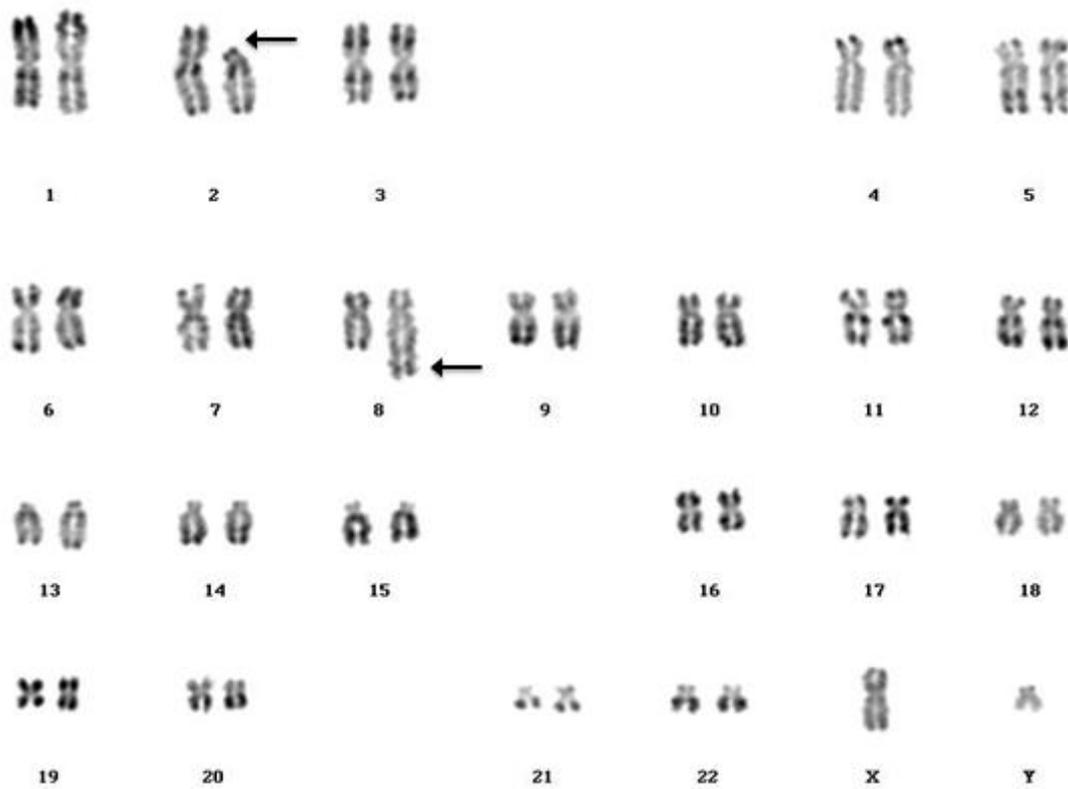
Annexe 1 : Caryotypes (1/3)

Translocation *MYC-IGH* : t(8;14)



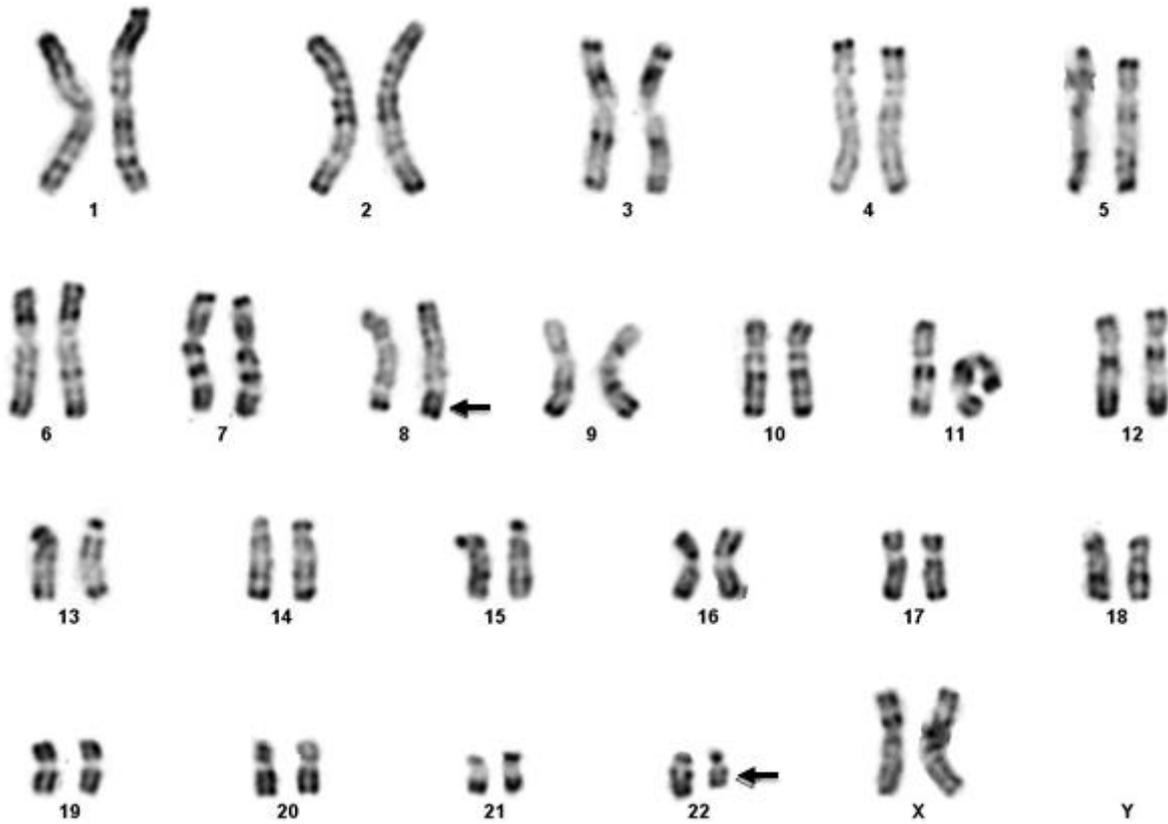
Annexe 1 : Caryotypes (2/3)

Translocation *MYC-IGK* : t(2;8)



Annexe 1 : Caryotypes (3/3)

Translocation *MYC-IGL* : t(8;22)



Annexe 2 : Mode opératoire FISH

Préparation et étalement sur lames

Sortir les échantillons du congélateur à -20°C environ 30 minutes à l'avance.

Centrifuger 10 min à 1000 RPM, puis ôter le surnageant.

Ajouter du fixateur frais pour obtenir une suspension légèrement opalescente.

Essuyer et identifier les lames dégraissées dans l'éthanol absolu pendant 8 jours.

Graver l'emplacement du spot au verso.

Poser les lames sur un papier absorbant imbibé d'eau.

Laisser tomber une goutte d'échantillon ou 5 µL si culot cellulaire pauvre.

Laisser sécher à température ambiante, sécher le verso avec un papier absorbant.

Transvaser le reste de suspension dans un tube sérothèque et recongeler à -20°C.

Prétraitement des lames avant hybridation

- 1- Vieillessement des lames pendant 20 minutes dans du 2X SSC préchauffé au bain-marie à 37°C.
- 2- Rinçage des lames dans du PBS 1X pendant 2 minutes à température ambiante.
- 3- Déshydratation par bains successifs d'éthanol à température ambiante : 70% 1 minute, 85% 1 minute, 100% 1 minute.
- 4- Laisser sécher à température ambiante.

Préparation des sondes

Sondes Abbott Vysis

Décongeler les sondes à température ambiante et à l'obscurité.

Vortexer et centrifuger quelques secondes.

Préparer 5 µL de solution par spot dans un eppendorf.

Vortexer et centrifuger le mélange. Placer les eppendorfs dans l'obscurité.

- Sondes locus spécifiques

	Pour 1 spot	Pour 2 spots	Pour 1 spot à 2 sondes
Sonde	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL + 0,5 µL
Tampon Vysis	3,5 µL	7µL	3,5 µL
H2O	1 µL	2,5 µL	0,5 µL

- Sondes centromériques : 1µL de sonde + 4µL de tampon WCP

Sondes Dako

Sortir du réfrigérateur.

Vortexer et centrifuger quelques secondes.

Pipeter 5µL de sonde par patient et transférer dans un eppendorf.

Placer les eppendorfs à l'obscurité.

Peintures Cytozell Aquarius

Décongeler les sondes à température ambiante et à l'obscurité.

Vortexer et centrifuger quelques secondes.

Pipeter 5µL de sonde par patient et transférer dans un eppendorf.. Le placer à l'obscurité.

Mélange de sondes CEP8 + IGH

Décongeler les sondes à température ambiante et à l'obscurité.

Vortexer et centrifuger.

Dans un eppendorf, mélanger pour un spot : 0,25µL de sonde CEP8, 0,5µL de sonde break-apart *IGH*, 1µL d'eau et 3,5µL de tampon Vysis.

Dénaturation et hybridation conjointes des lames et des sondes

Déposer 5 µL de sonde sur le spot correspondant.

Déposer une lamelle 22x22, attendre la diffusion de la sonde sur le spot et sceller la lamelle au rubber cement. Chasser les bulles d'air avec une pince.

Déposer les lames scellées sur la plaque, compléter si besoin avec des lames blanches.

Laisser incubé 5 min à 37°C.

Lancer le programme approprié au type de sonde :

- Sondes Vysis et mélange CEP8-IGH : dénaturation à 75°C pendant 4 minutes puis hybridation à 37°C pendant 20 heures.
- Sondes centromériques : dénaturation à 73°C pendant 1 minute puis hybridation à 37°C pendant 20 heures.
- Sondes Dako : dénaturation à 78°C pendant 5 minutes puis hybridation à 37°C pendant 20 heures.
- Sondes peintures : dénaturation à 75°C pendant 2 minutes puis hybridation à 37°C pendant 20 heures.
- Pour le mélange CEP8 + IgH, le programme utilisé a été le même que celui des sondes Abbott Vysis.

Laisser les lames au moins 5 min à 37°C après la fin de la phase d'hybridation.

Stopper le programme d'hybridation.

Retirer les lames et les placer en chambre humide à l'étuve à 37°C pendant une nuit.

Traitement post-hybridation des lames

Sortir les lames de la chambre humide.

Enlever le rubber cement avec une pince et décoller la lamelle.

1^{er} lavage : 2 minutes dans le 0,4X SSC / 0,3% triton à 73°C

Ou, pour les peintures : 2 minutes dans le 0,4X SSC à 73°C.

2^e lavage : 30 secondes à 1 min dans le 2X SSC / 0,1% triton à température ambiante

Ou, pour les peintures : 30 secondes à 1 min dans le 2SSC tween20 à température ambiante.

3^e lavage : un aller-retour dans l'eau distillée température ambiante, sauf pour les peintures.

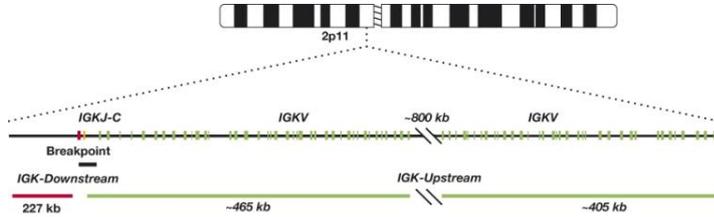
Laisser sécher à l'obscurité à température ambiante.

Déposer une goutte de DAPI sur le spot et recouvrir avec une lamelle 24x60.

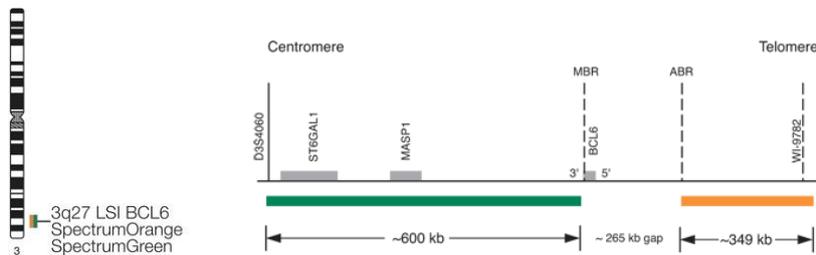
Si lecture différée : mettre les lames à 4°C.

Annexe 3 : Références et cartographie des sondes utilisées (1/2)

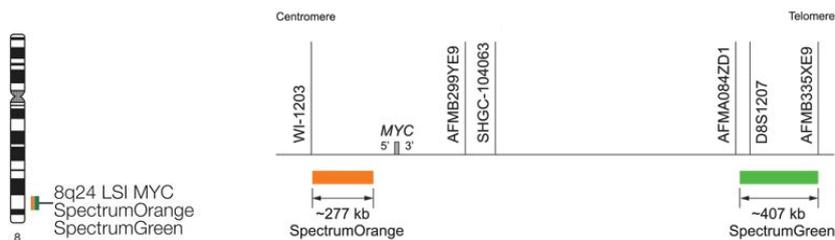
Sonde break-apart IGK (Dako®)



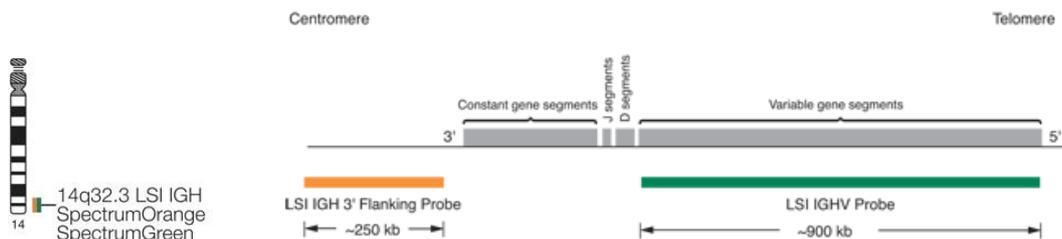
Sonde break-apart Vysis LSI BCL6 (Abbott Molecular®)



Sonde break-apart Vysis LSI MYC (Abbott Molecular®)

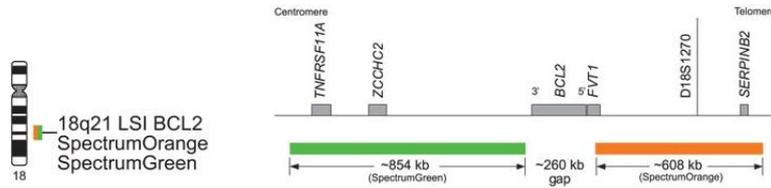


Sonde break-apart Vysis LSI IGH (Abbott Molecular®)

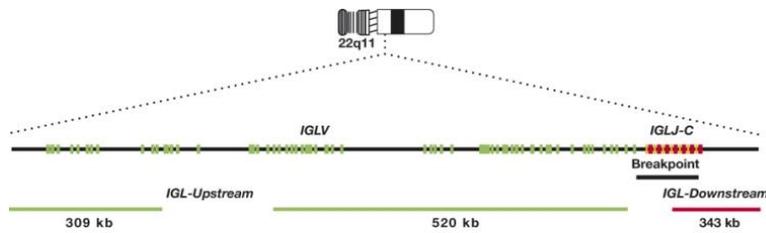


Annexe 3 : Références et cartographie des sondes utilisées (2/2)

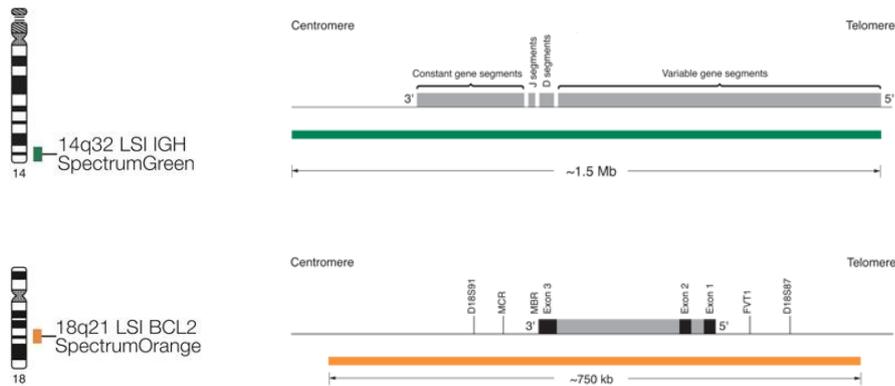
Sonde break-apart Vysis LSI BCL2 (Abbott Molecular®)



Sonde break-apart IGL (Dako®)



Sonde double couleur - double fusion Vysis LSI IGH/BCL2 (Abbott Molecular®)



Sonde CEP8 (Abbott Molecular®)

Peinture de chromosome 3 (Cytocell Aquarius®)

Annexe 4 : Interprétation des RFI et MFI en CMF

Marqueur	Valeurs seuils			
CD5	RFI	< 3	> 3	
	Interprétation	NEG	POS	
CD10	RFI	< 2	> 2	
	Interprétation	NEG	POS	
CD20	RFI	< 2	2 à 90	> 90
	Interprétation	NEG	INT	FORT
CD22	RFI	< 2	2 à 90	> 90
	Interprétation	NEG	INT	FORT
CD23	RFI	< 3	> 3	
	Interprétation	NEG	POS	
CD79b	RFI	< 2	2 à 20	> 20
	Interprétation	NEG	INT	FORT
FMC7	RFI	< 2	2 à 13,5	> 13,5
	Interprétation	NEG	INT	FORT
slg	MFI	< 6900 ou 9400	Kappa > 6900	Lambda > 9400
	Interprétation	FAIBLE	FORT	FORT
CD38	RFI	< 2	2 à 90	> 90
	Interprétation	NEG	INT	FORT
CD81	MFI	< 1100	> 1100	
	Interprétation	FAIBLE	FORT	
CD43	RFI	< 2	2 à 8	> 8
	Interprétation	NEG	INT	FORT

NEG : Négatif

INT : Intermédiaire

POS : Positif

Annexe 5 : Caractéristiques cliniques des patients (1/2)

N°	Sexe	Age (ans)	PS	Stade	Nombre de LEG	LDH	MO	SNC	IPI / IPIa
1	M	55,8	4	IV	3	>N	+	+	4 / 3
2	F	70,3	1 / 2	IV	2	>N	+	-	4
3	F	69,5	1 / 2	IV	4	>N	+	+	4
4	F	69,0	3	IV	1	>N	+	-	4
5	M	47,7	2	IV	1	>N	+	-	2 / 2
6	M	36,5	1	IV	3	>N	+	+	3 / 2
7	F	66,0	3	IV	1	>N	-	-	4
8	M	62,2	1	IV	1	>N	+	-	3
9	F	54,6	1	III	0	>N	-	-	2 / 2
10	M	73,1	4	IV	1	>N	+	-	4
11	M	72,9	1	IV	2	>N	+	NR	4
12	M	55,3	4	IV	2	N	+	+	2 / 2
13	M	59,7	4	IV	4	>N	+	+	4 / 3
14	M	59,9	3	IV	1	>N	+	-	3 / 3
15	F	49,4	0	IV	3	>N	+	+	3 / 2
16	M	69,1	2	IV	1	>N	-	-	3
17	F	76,7	1	IV	1	NC	+	NR	2 ou 3
18	M	70,4	2	IV	1	>N	+	-	3
19	M	58,1	0	IV	0	>N	-	-	2 / 2
20	M	75,2	1	IV	1	>N	+	-	3
21	F	65,6	1	IV	1	>N	+	NR	3
22	M	63,9	4	IV	1	>N	+	-	4
23	F	73,2	0	II	1	>N	-	-	2
24	M	64,8	3	IV	1	>N	-	+	4
25	M	54,2	1	IV	4	>N	+	+	3 / 2
26	F	68,1	3	IV	1	>N	+	-	4
27	M	66,5	1	IV	2	>N	+	-	4
28	F	70,3	1	IV	2	>N	+	-	4
29	M	75,9	2	IV	2	>N	+	-	4
30	F	44,5	2	IV	4	>N	+	+	3 / 2
31	F	57,1	1	IV	2	>N	-	-	3 / 2
32	F	63,7	1	IV	1	>N	+	-	3
33	M	76,2	1	IV	5	>N	NR	+	4
34	M	45,5	3	IV	3	>N	+	-	4 / 3
35	M	55,8	1	IV	2	>N	-	+	3 / 2
36	M	73,5	0	IV	3	>N	+	+	3

N° : Identification du patient; MO : envahissement médullaire; SNC : envahissement méningé;

M : masculin; F : féminin; > N : supérieur à la normale, N : normal; NC : non connu;

+ : envahi; - : non envahi; NR : BOM ou ponction lombaire non réalisée

Annexe 5 : Caractéristiques cliniques des patients (2/2)

N°	Traitement	RC atteinte?	Evolution	Survie globale (mois)
1	COP, ?, autogreffe	Oui	Décès	7,7
2	CHOP	Oui	Décès	8,7
3	COP, COPADEM	Non	Décès	2,0
4	R CHOP	Non	Décès	4,9
5	R CEEP, autogreffe → rechute : RCHOP	Oui	Décès	5,9
6	COP, COPADEM, R CEEP, autogreffe	Oui	Décès	3,4
7	R CHOP	Oui	Décès	16,3
8	R DHAP, GEMOX	Non	Décès	3,9
9	R CEEP, MTX ARAC, autogreffe	Oui	Décès	8,9
10	R CHOP	Non	Décès	7,4
11	Palliatif	NA	Décès	3,5
12	R COP, COPADM puis palliatif	Non	Décès	3,0
13	R COP	NA	Décès	0,5
14	COP, R CEEP, R MTX ARAC, R CHOP	Oui	Décès	12,0
15	R COPADM, CYVE, autogreffe → rechute: radiothérapie	Oui	Rechute	81,6
16	COP, R COPADEM, R CHOP	Non	Décès	9,5
17	R COP, R CHOP	Non	Décès	6,7
18	R COP, R mini-CHOP, R DHAC	Non	Décès	9,3
19	R CHOP, R DHAC, autogreffe → rechute : COP	Oui	Décès	24,7
20	COP, RCHOP	Oui	Décès	32,1
21	COPADEM	Non	Décès	2,6
22	COP	NA	Décès	0,7
23	R CHOP, R COPADEM, CYM	Non	Décès	2,9
24	COP, R CHOP, R COPADM, R CHOP + MTX, autogreffe → rechute : R CHOP, R DHAC, rituximab	Oui	RC	29,5
25	R CHOP, R COPADM, R CYVE, autogreffe, mini-allogreffe	Oui	RC	29,8
26	R COP, R COPADEM	Non	Décès	2,6
27	COP, R CHOP	Oui	Décès	8,6
28	COP, R CHOP, R CHOP MTX	Non	Décès	4,8
29	COP, R CHOP	Non	Décès	2,3
30	R COPADEM, R CHOP	Oui	Décès	7,5
31	R CHOP, autogreffe → rechute : DHAC	Oui	Décès	12,1
32	COP, R CHOP, autogreffe	Oui	RC	16,6
33	Palliatif	NA	Décès	0,3
34	COP, R COPADEM, R CHOP, autogreffe, mini-allogreffe	Oui	RC	14,4
35	COP, R COPADM, CYVE, autogreffe, mini-allogreffe	Oui	Décès	9,1
36	COP, R CHOP, MTX	Oui	Décès	5,4

N° : Identification du patient; ? : traitement inconnu; RC : Rémission Complète; NA : Non Applicable

Annexe 6 : Résultats d'anatomopathologie

N°	Diagnostic	GC/ non-GC	CD10	BCL2	BCL6	MUMI	MiB1	MYC
2	DLBCL							
3	DLBCL			POS			> 50%	
5	DLBCL	GC	POS	POS	POS	NEG	90%	
7	DLBCL			POS		NEG	60-70%	
9	DLBCL			POS			>80%	
10	Aspect atypique de lymphome	GC		POS		NEG		
11	DLBCL	GC	POS	POS	POS		80%	30%
13	DLBCL	GC	POS	POS	POS		80%	
14	DLBCL	GC	POS	POS		NEG	95%	90%
15	DLBCL	GC	POS	POS	POS		90%	100%
16	DLBCL	Non-GC	Douteux	POS	Faible	40%	80%	30-40%
17	DLBCL							
18	DLBCL	GC	POS	NEG				70-80%
19	DLBCL							
21	Compatible avec une LAL		POS					NI
22	DLBCL							
23	BCLU		NEG	NEG	POS		90%	
24	BCLU		POS	POS			90%	
27	DLBCL	Non-GC	POS	NEG	NEG		80%	
29	DLBCL	GC	POS	POS	POS	30-40%	90%	> 90%
30	BCLU			NI			NI	
31	DLBCL	GC	POS	NEG			100%	100%
32	DLBCL	GC	POS	NEG			100%	
33	DLBCL	GC	POS	POS	POS		70%	80%
34	BCLU	GC	POS	NEG				NI
35	DLBCL							

N° : Identification du patient ; NEG : Négatif; POS : positif; NI : Non Interprétable

Annexe 7 : Résultats de cytogénétique (1/5)

Patient	Matériel	FISH <i>MYC</i>	FISH t(14;18)	FISH <i>BCL6</i>	Profil <i>MYCR</i>	Partenaire <i>MYC</i>
1	Sang	Positif	Positif	Négatif	DH <i>BCL2</i>	t(2;8)
2	Moelle	Positif	QI	QI	Indéterminé	Non identifié
3	Pleural	Positif	Positif	Positif	TH	Non identifié
4	Moelle	Positif	Positif	Positif	TH	t(8;22)
5	Sang	Positif	Positif	Positif	TH	Gène non Ig
6	Moelle	Positif	Positif	Négatif	DH <i>BCL2</i>	t(8;14)
7	Pleural	Positif	Positif	Positif	TH	Gène non Ig
8	Moelle	Positif	Négatif	Positif	DH <i>BCL6</i>	Gène non Ig
9	Empreinte ganglion	Positif	Négatif	Négatif	SH	Pas de matériel
10	Moelle	Positif	Positif	Négatif	DH <i>BCL2</i>	Non identifié
11	Ganglion	Positif	Positif	Négatif	DH <i>BCL2</i>	Gène non Ig
12	Moelle	Positif	Positif	Négatif	DH <i>BCL2</i>	t(8;14)
13	Cytospin LCR	Positif	Positif	Négatif	DH <i>BCL2</i>	Pas de matériel
14	Sang	Positif	Négatif	Négatif	SH	Non identifié
15	Moelle	Positif	Positif	Positif	TH	t(8;22)
16	Sang	Positif	Négatif	Négatif	SH	t(8;14)
17	Moelle	Positif	Négatif	Positif	DH <i>BCL6</i>	Gène non Ig
18	Moelle	Positif	Négatif	Négatif	SH	t(8;14) atypique
19	Moelle	Positif	Négatif	Positif	DH <i>BCL6</i>	t(8;14)
20	Sang	Positif	Positif	Négatif	DH <i>BCL2</i>	Non identifié
21	Moelle	Positif	Positif	Négatif	DH <i>BCL2</i>	t(8;14)
22	Moelle	Positif	Positif	Positif	TH	Non identifié
23	Empreinte tumeur	Positif	Négatif	Négatif	SH	Pas de matériel
24	Empreinte tumeur	Positif	Positif	Négatif	DH <i>BCL2</i>	Pas de matériel
25	Sang	Positif	Négatif	Négatif	SH	t(8;14)
26	Moelle	Positif	Positif	Positif	TH	t(8;22)
27	Moelle	Positif	Négatif	Négatif	SH	t(8;22)
28	Moelle	Positif	Positif	Positif	TH	Gène non Ig
29	Ganglion	Positif	Positif	Négatif	DH <i>BCL2</i>	t(8;22)
30	Moelle	Positif	Négatif	Positif	DH <i>BCL6</i>	t(8;14)
31	Empreinte tumeur	Positif	Positif	Négatif	DH <i>BCL2</i>	Pas de matériel
32	Empreinte tumeur	Positif	Négatif	Négatif	SH	Pas de matériel
33	Empreinte ganglion	Positif	Positif	Négatif	DH <i>BCL2</i>	Pas de matériel
34	Sang	Positif	Négatif	Positif	DH <i>BCL6</i>	t(8;14)
35	LCR	Positif	Positif	Positif	TH	t(8;14)
36	Sang	Positif	Négatif	Négatif	SH	t(8;14)

Annexe 7 : Résultats de cytogénétique (2/5)

Patient	Caryotype et formules FISH
1	<p>47,XY, -2, add(3)(q27), der(8)t(2;8)(p12;q24), add(9)(q34), t(14;18),(q32;q21), +17, +mar[10]/46,XY[10]</p> <p>nuc ish 8q24(MYC3'x2, MYC5'x2)(MYC3' sep MYC5' x1)[74%] nuc ish 14q32 (IgHx2)(bcl2 con IgH x1),18q21(bcl2x2)[83%] nuc ish 3q27 (BCL6-3'x2, BCL6-5'x2) nuc ish 2p11(IgK3'x2, IgK5'x2)(IgK3' sep IgK5' x1)[72%]</p>
2	<p>50,XX,t(1;4)(p11;p16),add(3)(q25-26),+5,-6,dup(8)(q13q24),+10,+13,add(14)(q32), add(15)(q21),+18,add(19)(p13),+mar[17]/46,XX[3]</p> <p>nuc ish 8q24 (MYC3'x2, MYC 5'x2)(MYC3' sep MYC5' x1)[84%]</p>
3	<p>Caryotype NR</p> <p>nuc ish 8q24 (MYC3'x2, MYC5'x2)(MYC3' sep MYC5' x1)[76%] nuc ish 14q32 (IgHx2)(bcl2 con IgH x1),18q21(bcl2x2)[90%] nuc ish 3q27 (BCL6-3'x2, BCL6-5'x2)(BCL6-3' sep BCL6-5' x1)[84%] nuc ish 14q32 (IgH3'x2, IGH5' x2)(IgH3' sep IGH5' x2)[45%] nuc ish 2p11(IgK3'x2, IgK5'x2) nuc ish 22q11(IgL3'x2, IgL5'x2)</p>
4	<p>74-75,XX,+X,add(X)(q2?5),+iso(1q),+2,+3,+3,der(3)(3pter->3q27::8q13->8q24::22q11->22q ter),+4,+4,t(4;7)(q24-25;q35),+5,+6,+7,+7,t(8;22)(q24;q11),+9,+9,+11,+12,+12,+13,t(14;18)(q32;q21),+15,+16,+16,+17,add(17)(p12),+18,+19,+20,+21,+21,+mar1,+mar2,+mar3[20]</p> <p>nuc ish 14q32 (IgHx2)(bcl2 con IgH x1),18q21(bcl2x2) nuc ish 8q24 (MYC3'x2, MYC5'x2)(MYC3' sep MYC5' x1) nuc ish 3q27 (BCL6-3'x3, BCL6-5'x4)[28%]</p>
5	<p>Caryotype complexe : formule impossible à établir</p> <p>nuc ish 14q32 (IgHx3)(bcl2 con IgH x1),18q21(bcl2x2)[38%] nuc ish 8q24(MYC3'x2, MYC5'x2)(MYC3' sep MYC5' x1)[44%] nuc ish 3q27(BCL6-3'x2, BCL6-5'x1)[46%] nuc ish 2p11(IgK3'x2, IgK5'x2)</p>
6	<p>52,XY,+X, +Y, +7, del(9)(p13p24), t(8.14), add(14)(q32), add(18)(q21), +20, +der(21)t(1;21)(q11,p11)</p> <p>nuc ish 14q32 (IgHx2)(bcl2 con IgH x1),18q21(bcl2x2) nuc ish 8q24 (MYCx2) (MYC con IgH x2),14q32(IgHx2) nuc ish 3q27 (BCL6-3'x2, BCL6-5'x2)</p>
7	<p>48~50,XX,add(3)(q27),+3,iso(6)(p10),-8,add(9)(p12-13),-14,add(18)(q21),+mar1,+mar2,+min1,+min2,inc[cp10]/46,XX[5]</p> <p>nuc ish 8q24(MYC3'x2, MYC5'x2)(MYC3' sep MYC5' x1)[66%] nuc ish 14q32 (IgHx2)(bcl2 con IgH x1),18q21(bcl2x2)[85%] nuc ish 2p11(IgK3'x2, IgK5'x2) nuc ish 22q11(IgL3'x2, IgL5'x2) nuc ish 3q27(BCL6-3'x2, BCL6-5'x2) (BCL6-3' sep BCL6-5' x1)[77%]</p>
8	<p>46,XY,add(3)(q27)x2,add(4)(qter),+add(7)(p12),add(8)(q24),add(14)(q32),-16,add(17)(p11),del(18)(q21)[20]</p> <p>nuc ish 8q24(MYC3'x2, MYC5'x2)(MYC3' sep MYC5' x1)[70%] nuc ish 3q27(BCL6-3'x2, BCL6-5'x2) (BCL6-3' sep BCL6-5' x1)[80%] nuc ish 14q32 (IgH3'x3, IGH5' x2)(IgH3' sep IGH5' x2)[90%] nuc ish 14q32 (IgHx2),18q21(bcl2x2)</p>

Annexe 7 : Résultats de cytogénétique (3/5)

9	<p>Caryotype non réalisé</p> <p>nuc ish 14q32(IgHx2),18q21(bcl2x3)</p> <p>nuc ish 8q24(MYC3'x2, MYC5'x3)(MYC3' sep MYC5')</p> <p>nuc ish 3q27(BCL6-3'x2, BCL6-5'x2)</p>
10	<p>Echec du caryotype</p> <p>nuc ish 14q32(IgHx2)(bcl2 con IgH x1),18q21(bcl2 x2)[27%]</p> <p>nuc ish 8q24(MYC3'x2, MYC5'x2)(MYC3' sep MYC5' x1)[22%]</p> <p>nuc ish 3q27(BCL6-3'x2, BCL6-5'x2)[100]</p> <p>nuc ish 2p11(IgK3'x2, IgK5'x3) (IgK3' sep IgK5' x)[24%]</p> <p>nuc ish 22q11(IGL3'x2, IGL5'x2)</p>
11	<p>47,XY,add(4)(p13-15),+7,t(14;18)(q32;q21)[18]/48,idem,+mar[2]</p> <p>nuc ish 14q32 (IgHx2)(bcl2 con IgH x1),18q21(bcl2x2)[98%]</p> <p>nuc ish 8q24(MYC3'x2, MYC-5'x2)(MYC-3' sep MYC-5' x1)[90%]</p> <p>nuc ish 3q27(BCL6-3'x2, BCL6-5'x2)[91]</p>
12	<p>Caryotype complexe : formule impossible à établir</p> <p>nuc ish 14q32 (IgH x2 ou x3) (bcl2 con IgH x1),18q21(bcl2x2)[82%]</p> <p>nuc ish 8q24(MYC3'x2, MYC5'x2)(MYC3' sep MYC5')[70%]</p> <p>nuc ish 8q24(MYCx2),14q32(IgH x2 ou x3)(MYC con IgH x1)</p>
13	<p>Caryotype non réalisé</p> <p>nuc ish 8q24(MYC3'x2, MYC5'x2)(MYC3' sep MYC5')[49/50]</p> <p>nuc ish 14q32(IgH x3 ou x4),18q21(bcl2 x3 ou x4)(IgH con bcl2 x2)[18]</p> <p>nuc ish 3q27(BCL6-3'x2, BCL6-5'x2)[99/100]</p>
14	<p>Caryotype non réalisé</p> <p>nuc ish 14q32(IgHx2),18q21(bcl2x1)[71%]</p> <p>nuc ish 14q32(IgHx2),18q21(bcl2x1)</p> <p>nuc ish 8q24(MYCx2)(MYC3' sep MYC5' x1)[82/100]</p> <p>nuc ish 3q27 (BCL6-3'x2, BCL6-5'x2)</p> <p>nuc ish 2p11(IgK3'x2, IgK5'x3) (IgK3' sep IgK5' x1)[76%]</p> <p>nuc ish 22q11(IGL3'x1, IGL5'x1)</p>
15	<p>65~72,XX,+X,+del(1)(p21)x2,+2,t(3;22)(q27;q11),+5,+7,+7,+8,t(8;22)(q24;q11),+9,+13,t(14;18)(q32;q21),+der(14)t(14;18)(q32;q21),+17,?+18,+21,+21,+mar x2,inc[14]/46,XX[6]</p> <p>nuc ish 14q32 (IgH x2 ou x3) (bcl2 con IgH x2 ou x3),18q21(bcl2 x2 ou x3)</p> <p>nuc ish 8q24 (MYCx2) (MYC con IGL x1), 22q11 (IGL x2)</p> <p>nuc ish 3q27 (BCL6x2) (BCL6 con IGL x1), 22q11 (IGL x2)</p>
16	<p>Caryotype complexe : formule impossible à établir</p> <p>nuc ish 8q24(MYCx2)(MYC3' sep MYC5' x1)[78%]</p> <p>nuc ish 14q32(IgH x3 ou x4),18q21(bcl2 x3 ou x4)[74%]</p> <p>nuc ish 3q27(BCL6x3) [70%]</p>
17	<p>Caryotype complexe : formule impossible à établir</p> <p>nuc ish 8q24(MYCx2)(MYC3' sep MYC5' x1)[78%]</p> <p>nuc ish 14q32(IgH3' x2, IgH5' x2)</p> <p>nuc ish 14q32 (IgHx2), 18q21 (bcl2x2)</p> <p>nuc ish 3q27(BCL6-3'x2, BCL6-5'x2) (BCL6-3' sep BCL6-5' x1)</p> <p>nuc ish 2p11(IgK3'x2, IgK5'x2)</p> <p>nuc ish 22q11(IGL3'x2, IGL5'x2)</p>
18	<p>46,XY,add(2)(p2'3),der(8)?t(8;14)(q24;q32)?inv(8)(p12q24),der(14)t(8;14)(q24;q32)[cp4]/46,XY[16]</p> <p>nuc ish 8q24(MYCx2)(MYC3' sep MYC5' x1)[9%]/8q24(MYCx2)[91%]</p>

Annexe 7 : Résultats de cytogénétique (4/5)

19	<p>49,XY,-3,+4,add(6)(q23),del(7)(q22q36),+del(7)(q22q36),t(8;14)(q24;q32), add(11)(q24),+marx2[3]/50,sl,+13[5]/49,sdl1,-21[11]/46,XY[1].</p> <p>nuc ish(MYCx2)(MYC3' sep MYC5' x1)[85%] nuc ish(IGHx3),(BCL2x4)[90%] nuc ish(BCL6x2)(3'BCL6 sep 5'BCL6x1)[80%]</p>
20	<p>Echec du caryotype</p> <p>nuc ish 8q24(MYCx2)(3'MYC sep 5'MYCx1)[70%] nuc ish 14q32(IgHx4),18q21(bcl2x3),(bcl2 con IgH x2)[61%] nuc ish 3q27(BCL6x2)</p>
21	<p>48,XX,+i(1)(q10),t(3;9)(q21;p2?2),t(8;14)(q24;q32),t(14;18)(q32;q21), add(16)(p13),+der(18)t(14;18)(q32;q21)[14]/46,XX[6]</p> <p>nuc ish 8q24(MYCx2)(3'MYC sep 5'MYCx1)[67%] nuc ish 14q32(IgHx5),18q21(bcl2x4),(bcl2 con IgH x3)[73%] nuc ish 3q27 (BCL6-3'x2, BCL6-5'x2)</p>
22	<p>Echec du caryotype</p> <p>nuc ish 8q24(3'MYCx6)(5'MYCx5)(3'MYC con 5'MYCx4)[35%] nuc ish 14q32(IgHx6),18q21(bcl2x5),(bcl2 con IgHx4)[23%] nuc ish 3q27(5'BCL6x4)(3'BCL6x3)(3'BCL6 con 5'BCL6x2)[44%]</p>
23	<p>Caryotype non réalisé</p> <p>nuc ish 8q24(MYCx2)(3'MYC sep 5'MYC x1)[50%] nuc ish 14q32(IgHx2),18q21(bcl2x2)[100%] nuc ish 3q27(BCL6x2)[100%]</p>
24	<p>Caryotype non réalisé</p> <p>nuc ish (5'MYCx3)(3'MYCx2)(3'MYC con 5'MYC x1) nuc ish(IgHx4),(BCL2x3),(BCL2 con IgH x2) nuc ish(BCL6x2)</p>
25	<p>47,X,-Y,add(3)(p25),add(4)(p15),t(8;14)(q24;q32),-10,-11,i(18)(q10),- 19,add(19)(qter),+mar1,mar2,mar3,mar4,inc[cp12] surexpression bcl2</p> <p>nuc ish 8q24(MYCx2)(3'MYC sep 5'MYCx1)[80%] nuc ish 14q32(IgHx3),18q21(bcl2x6)[74%] nuc ish 3q27(BCL6x3)[64%]</p>
26	<p>47,XX,add(1)(p36),t(3;9)(q27;p12),del(3)(p1?3p25),add(4)(p16),del(6)(q1?6q24), t(8;22)(q24;q11),+der(8)t(8;22)(q24;q11),t(14;18)(q32;q21)[6]/48,idem, +mar[3]/46,XX[11]</p> <p>nuc ish (5'MYCx3)(3'MYCx2)(3'MYC con 5'MYCx1)[68%] nuc ish(IgHx3),(BCL2x3),(BCL2 con IgHx2)[76%] nuc ish(BCL6x2)(3'BCL6 sep 5'BCL6x1)[65%]</p>
27	<p>71<3n>,XX,-Y,+1,del(5)(q21q34),+del(5)(q21q34),t(8;22)(q24;q11)x2, del(11)(q14),+12,-13,-14,-15,-18,-19,+20,-21,+22,+mar1,+mar2x2[8]/46,XY[8]</p> <p>nuc ish(MYCx3)(3'MYC sep 5'MYCx2)[18%] nuc ish(IGH,BCL2)x2[95%] nuc ish(BCL6x3)[18%]</p>
28	<p>Caryotype complexe : formule impossible à établir</p> <p>nuc ish (MYCx2)(5'MYC sep 3'MYC x1)[49%] nuc ish (IGHx2 à x4),(BCL2x3),(BCL2 con IGHx1)[81%] nuc ish (BCL6x2)(5'BCL6 sep 3'BCL x1)[90%] nuc ish 2p11(IgK3'x2, IgK5'x2) nuc ish 22q11(IGL3'x2, IGL5'x2)</p>

Annexe 7 : Résultats de cytogénétique (5/5)

29	48~49,XY,del(6)(q11),t(8;22)(q24;q11),-9,-10,?der(11)t(1;11)(q21;p14),+12, t(14;18)(q32;q21),-15,+21,+mars,inc[10]. nuc ish (IgLx2)(5'IgL sep 3'IgL x1)[88%] nuc ish 14q32(IGHx3),18q21(BCL2x3),(BCL2 con IGH x2)[nombreux noyaux] nuc ish 8q24 (MYCx2)(3'MYC sep 5'MYC x1)[nombreux noyaux] nuc ish (BCL6x2)[majorité des noyaux]
30	48,X,-X,dup(1)(q25q?43),t(3;8;14)(q27;q24;q32),+6,+7,+12[18]/46,XX[2] nuc ish(MYCx2)(3'MYC sep 5'MYCx1)[20/100] nuc ish(IgHx3),(BCL2x2)[16/100] nuc ish(BCL6x2)(3'BCL6 sep 5'BCL6x1)[10/100] nuc ish(IgHx2)(3'IGH sep 5'IGHx1)[20/100]
31	Caryotype non réalisé nuc ish 8q24 (MYCx2)(3'MYC sep 5'MYC x1)[nombreux noyaux] nuc ish(IgHx3),(BCL2x3 ou x4),(BCL2 con IgH x2)[nombreux noyaux] nuc ish (BCL2x2 ou x3)(5'BCL2 sep 3'BCL2 x1)[nombreux noyaux] nuc ish(BCL6x2)[nombreux noyaux]
32	Caryotype non réalisé nuc ish 8q24 (MYC x2)(3'MYC sep 5'MYC x1)[70/100] nuc ish 14q32(IGHx3),18q21(BCL2 x2)[63/100] nuc ish 3q27(BCL6x2) [96/100]
33	Caryotype non réalisé nuc ish(BCL2x1)(5'BCL2 sep 3'BCL2x1)[67/100] nuc ish(BCL6x2)[100] nuc ish (MYCx2)(3'MYC sep 5'MYCx1)[66/100] nuc ish(IGHX5),(BCL2x2),(IGH con BCL2x2)[56/100]
34	46,XY,t(8;14)(q24;q32)[1]/46,XY,del(1)(p32p36),+1,der(3)t(3;14)(q27;q32), del(6)(q15),der(1;14)(q10;q10)t(3;14)(q27;q32),t(8;14)(q24;q32)[7]/46,XY(15) nuc ish (MYCx2)(3'MYC sep 5'MYCx1)[90/100] nuc ish (BCL6x2)(3'BCL6 sep 5'BCL6x1)[89/100] nuc ish (IGHX4),(BCL2x2) [90/100]
35	45~46,dup(1)(q10qter),add(3)(q25),t(8;14)(q24;q32),del(13)(q13q22),add(14)(q32), add(18)(q21),inc[10] nuc ish(MYCx2)(3'MYC sep 5'MYCx1)[85/100] nuc ish(IgHx4),(BCL2x3),(BCL2 con IgHx2)[84/100] nuc ish(BCL6x2)(3'BCL6 sep 5'BCL6x1)[80/100]
36	46,XY,t(7;13)(q11;p11),-8,t(8;14)(q24;q32),der(9)t(1;9)(q21;p23),del(11)(p1?3p14), i(18)(q10), -22,+mar1,+mar2[14]/46,XY[6] . nuc ish(MYCx2)(3'MYC sep 5'MYCx1)[90/100] nuc ish(IgHx4),(BCL2x3),(BCL2 con IgHx2)[84/100] nuc ish(BCL6x2)(3'BCL6 sep 5'BCL6x1)[80/100]

Annexe 8 : Résultats de cytométrie en flux (1/3)

N°	Profil	% CD19	Matériel	CD5		CD10		CD20		CD22	
				RFI	Interprétation	RFI	Interprétation	RFI	Interprétation	RFI	Interprétation
1	DH	96	pleural	-	NEG	8	POS	26, Partiel	INT	26	INT
2	ND	93	moelle - ficolll	5,6	FORT			79	INT	127	FORT
3	TH	97	pleural	-	NEG	3	POS	-	NEG	3	INT
4	TH	82	moelle - ficolll	9	FORT	-	NEG	21	INT	5 Partiel	INT
5	TH	90	moelle totale	-	NEG	-	NEG	15	INT	4	INT
6	DH	94	moelle totale	-	NEG	9	POS	49, Partiel	INT	-	NEG
8	DH	99	moelle - ficolll	-	NEG	10	POS	25	INT	15	INT
10	DH	91	moelle totale	-	NEG			24	INT	22	INT
12	DH	99	moelle totale	-	NEG	19	POS	51	INT	5	INT
13	DH	99	lcr	-	NEG	-	NEG	89	INT	45	INT
14	SH	1	sang total	56	FORT	10	POS	68	INT	173	FORT
15	TH	100	moelle-ficolll	-	NEG	18	POS	13, Partiel	INT	22	INT
16	SH	71	sang-ficolll	-	NEG	-	NEG	112	FORT		
18	SH	10	sang total	-	NEG	-	NEG	98	FORT	36	INT
19	DH	34	sang total	-	NEG	-	NEG	31	INT	121	FORT
20	DH	61	sang total	-	NEG	3	POS	50	INT	283	FORT
21	DH	17	sang total	-	NEG	7, Partiel	POS	8, Partiel	INT	79	INT
25	SH	77	sang total	21	FORT	-	NEG	173	FORT		
26	TH	94	moelle totale	-	NEG	19	POS	31, Partiel	INT	44	INT
27	SH	18	sang total	-	NEG	NC	POS	NC	FORT	136	FORT
28	TH	76	moelle-ficolll	-	NEG	15	POS	70	INT	41	INT
29	DH	2	moelle totale	-	NEG	-	NEG	286	FORT	913	FORT
30	DH	31	moelle totale	-	NEG	2	POS	88	INT	62	INT
31	DH	98	moelle totale	-	NEG			-	NEG	47	INT
34	DH	60	sang total	-	NEG	20	POS	51	INT	8	INT
35	TH	27	sang total	-	NEG	NC, Partiel	POS	NC	INT		
36	SH	87	sang total	-	NEG	-	NEG	137	FORT	34	INT

N° : Identification du patient, % CD19 : Pourcentage de cellules CD19+, NEG : Négatif, POS : Positif, INT : Intermédiaire.

NC : Non calculé (MFI non disponible : interprétation approximative sur le graphique)

Annexe 8 : Résultats de CMF (2/3)

N°	Profil	CD23		CD79b		Fmc7		slg		CD38	
		RFI	Interprétation	RFI	Interprétation	RFI	Interprétation	clonalité	Interprétation	RFI	Interprétation
1	DH	-	NEG	18	INT			K	FAIBLE	417	FORT
2	ND	-	NEG	11	INT	8	FAIBLE	L	FORT	6	INT
3	TH	-	NEG	7	INT	-	NEG	L	FAIBLE		
4	TH	-	NEG	9	INT	7	FAIBLE	K	FAIBLE		
5	TH	-	NEG	7	INT	3	FAIBLE	K	FORT	22	INT
6	DH			-	NEG	-	NEG	-	NEG	999	FORT
8	DH	-	NEG	3	INT	4	FAIBLE	K	FAIBLE	79	INT
10	DH	-	NEG	7	INT	7	FAIBLE	K	FAIBLE	170	FORT
12	DH	-	NEG	90	FORT	22	FORT	L	FORT	191	FORT
13	DH	4	FAIBLE	25	FORT	-	NEG	L	FORT	30	INT
14	SH	-	NEG	100	FORT	-	NEG	K	FORT	180	FORT
15	TH			5	INT			L	FAIBLE	100	FORT
16	SH			267	FORT			K	FAIBLE	34	INT
18	SH	3	FAIBLE	54	FORT	17	FORT	K	FORT	205	FORT
19	DH	-	NEG	13	INT	7	FAIBLE	K	FAIBLE	47	INT
20	DH	-	NEG	99	FORT	13	FAIBLE	K	FORT	62	INT
21	DH	-	NEG	-	NEG	12, Partiel	FAIBLE	-	NEG	1290	FORT
25	SH			190	FORT	12	FAIBLE	K	FORT	1095	FORT
26	TH	-	NEG	104	FORT	20	FORT	L	FORT	7007	FORT
27	SH			27	FORT			L	FORT	119	FORT
28	TH			55	FORT			K	FAIBLE	200	FORT
29	DH	-	NEG	247	FORT	83	FORT	K	FORT	45	INT
30	DH	-	NEG	51	FORT	28	FORT	K	FORT	488	FORT
31	DH	-	NEG	11	INT	-	NEG	-	NEG	919	FORT
34	DH			25	FORT			K	FAIBLE	67	INT
35	TH							L	FORT		
36	SH	-	NEG	84	FORT	56	FORT	K	FORT	14	INT

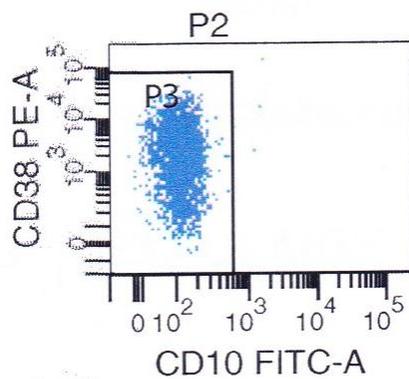
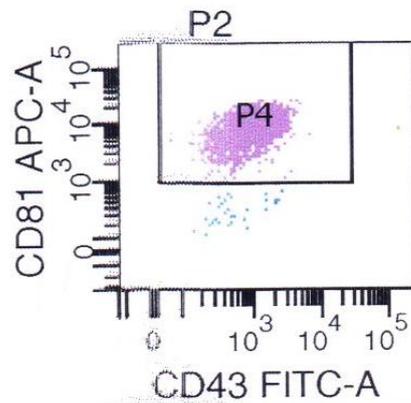
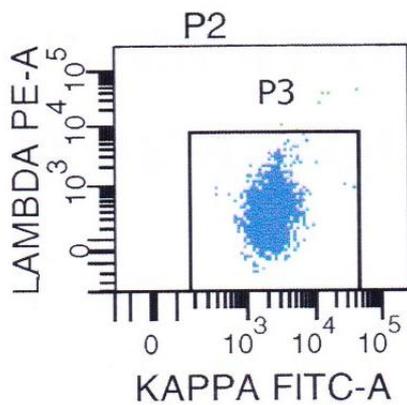
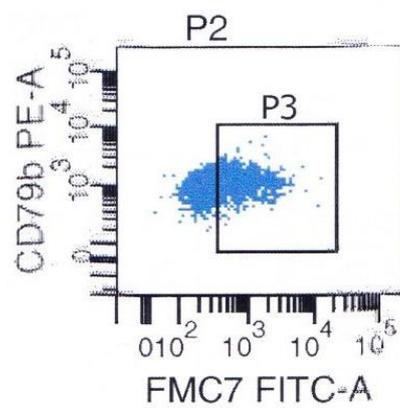
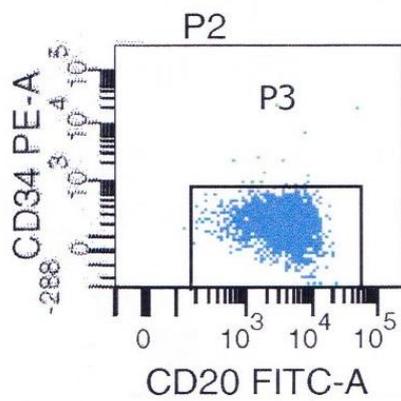
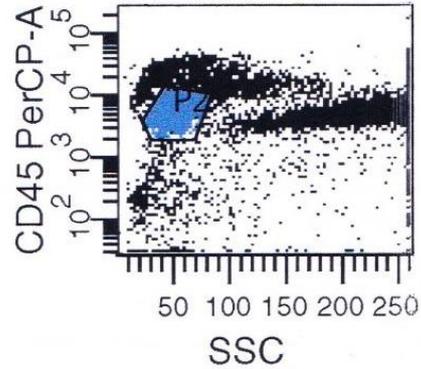
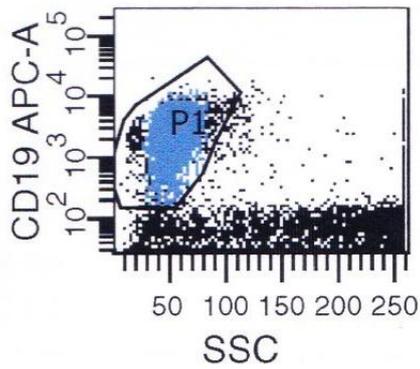
N° : Identification du patient, NEG : Négatif, INT : Intermédiaire, K : kappa, L : lambda

Annexe 8 : Résultats de CMF (3/3)

N°	CD81		CD43	
	MFI	Interprétation	RFI	Interprétation
19	7580	FORT	7	FORT
20				
21	12585	FORT		
25				
26	29890	FORT	21	FORT
27				
28	14046	FORT		
29	3300	FORT	-	NEG
30				
31	22557	FORT	55	FORT
34	15915	FORT		
35				
36	4117	FORT	2	FAIBLE

N° : Identification du patient, NEG : Négatif

Annexe 9 : Phénotype du patient 19 (DH)



Interprétation

Ciblage de la population CD19+ CD45+
en fonction de la structure (SSC).

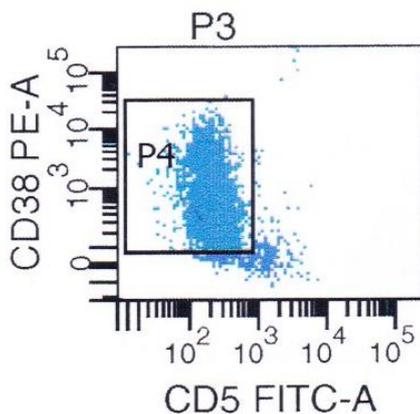
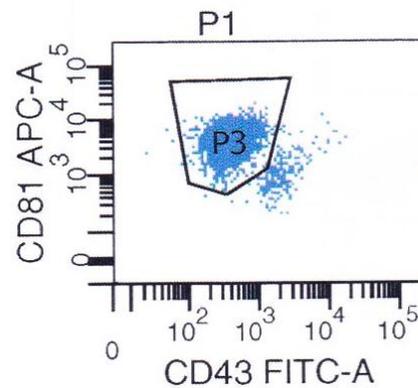
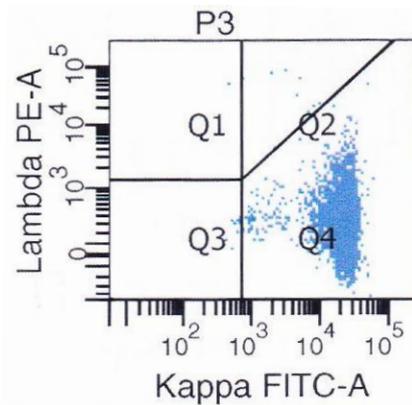
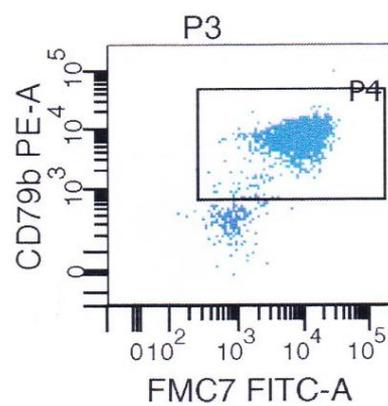
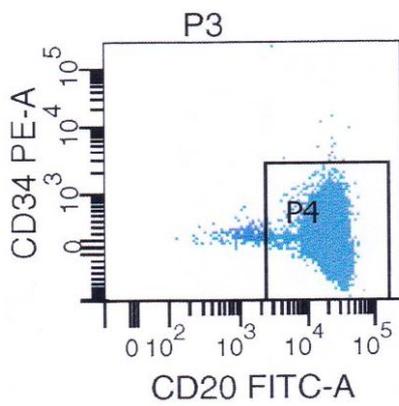
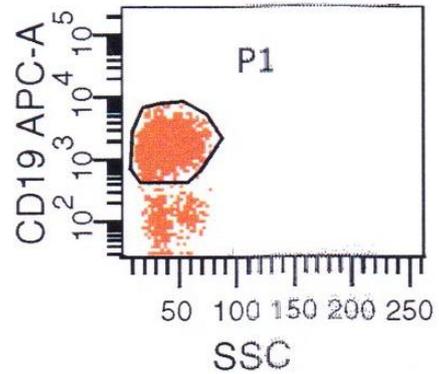
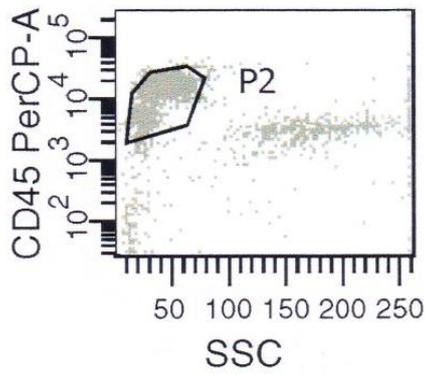
CD34- CD20 diminué

CD79b intermédiaire, Fmc7 faible

sIg kappa faibles, CD43+, CD81 fort

CD38+, CD10-

Annexe 10 : Phénotype du patient 36 (SH)



Interprétation

Ciblage de la population CD19+ CD45+ en fonction de la structure (SSC).

CD34- CD20 fort

CD79b fort, Fmc7 fort

sIg kappa fortes, CD43+, CD81 fort

CD38+, CD5-

Nom - Prénoms : **RAULT Emmanuelle, Marie**

Titre du mémoire-thèse :

Lymphomes B agressifs avec réarrangement de *MYC*, revue de la littérature et étude d'une cohorte régionale

Résumé du mémoire-thèse :

Ce travail a pour but de caractériser sur les plans clinique, morphologique, phénotypique et cytogénétique, une cohorte de 36 patients porteurs d'un lymphome avec réarrangement du gène *MYC*.

La présentation clinique est marquée par une dissémination extra-ganglionnaire fréquente, un stade avancé, un taux de LDH augmenté et un index pronostique international (IPI) élevé. Sur le plan cytogénétique, le caryotype complexe est constant et il existe, dans 72% des cas, une ou deux translocations associées impliquant *BCL2* et/ou *BCL6* (double hit : DH, ou triple hit : TH). L'étude immunohistochimique identifie une population cellulaire le plus souvent de type « centre germinatif » (GC), hautement proliférante et exprimant la protéine c-myc. En cytométrie en flux, hormis la confirmation des caractéristiques déjà publiées sur l'expression de CD20 et des immunoglobulines de surface, cette étude retrouve une nouvelle anomalie phénotypique concernant CD79b.

Au terme du suivi, 31 patients sont décédés avec une médiane de survie de 5,9 mois. Il semble exister une tendance à un plus mauvais pronostic pour les DH impliquant *BCL2* et les TH. Le partenaire de translocation de *MYC* associé à une survie plus favorable pourrait être le gène des chaînes lourdes des immunoglobulines *IGH*. Enfin, en immunohistochimie, l'expression de la protéine *BCL2* est corrélée à la présence d'une translocation de son gène et ne semble pas influencer sur le pronostic en absence de réarrangement.

Sur le plan thérapeutique, le rituximab et la greffe de cellules souches hématopoïétiques apportent un bénéfice significatif en terme de survie. En revanche, les chimiothérapies standard et intensive donne des résultats similaires.

Nombre de pages : 116. Nombre de références : 88.

MOTS CLÉS

DLBCL, BCLU, *MYC*, *BCL2*, *BCL6*, DOUBLE HIT

JURY

PRÉSIDENT : Pr Jean-Marie BARD
DIRECTEUR : Dr Marion EVEILLARD
ASSESEURS : Pr Marie Christine BENE
Dr Catherine GODON
Pr Steven LE GOUILL
Dr Anne MOREAU

Adresse de l'auteur : 234 boulevard Schuman, 44 300 NANTES