UNIVERSITÉ DE NANTES

———

FACULTÉ DE MÉDECINE

———

Année 2017 N° 155

THÈSE

pour le

DIPLÔME **D'ÉTAT** DE DOCTEUR EN MÉDECINE

SPÉCIALITÉ ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES

par

Othman LAGHMARI
né *à Rabat (MAROC)*

———

Présentée et soutenue publiquement le *12 Octobre 2017*

———

CARACTÉRISATION ANATOMO-CLINIQUE, CYTOGÉNÉTIQUE ET CORRÉLATION AVEC LE PROFIL MOLÉCULAIRE EN RT-MLPA D'UN SOUS TYPE DE LYMPHOME B DIFFUS A GRANDES CELLULES DE PHÉNOTYPE GC ABERRANT CD10+ MUM1+

———

Président du jury:
Madame le Professeur Céline BOSSARD
Directeur de thèse:
Madame le Professeur Céline BOSSARD
Membres du Jury :
Monsieur le Professeur Steven LE GOUIL
Madame le Professeur Marie-Christine BENE
Monsieur le Docteur Hervé MAISONNEUVE
Monsieur le Docteur Yannick LE BRIS
Madame le Docteur Anne MOREAU

"On opte, on tranche aussi longtemps qu'on s'en tient à la surface des choses; dès qu'on va au fond, on ne peut plus trancher ni opter, on ne peut plus que regretter la surface."

EM Cioran

Table des matières

1 INTRODUCTION **11**
1.1 Classification OMS et épidémiologie **12**
1.2 Lymphopoïèse B **13**
1.2.1 Étapes médullaires de différenciation **13**
1.2.2 Maturation des cellules B dans le centre germinatif **14**
1.2.2.1 Zone sombre du centre germinatif **15**
1.2.2.1.1 CD10 ..... *15*
1.2.2.1.2 MYC 16
1.2.2.1.3 BCL6 16
1.2.2.1.4 EZH2 16
1.2.2.2 Zone claire du centre germinatif **16**
1.2.2.2.1 Voie NF-Kb *17*
1.2.2.2.2 MUM1/iIRF4 17
1.2.2.3 BCL2 ..... **17**
1.3 Lymphomagénèse des DLBCL **18**
1.3.1 Démembrement moléculaire: classification selon la cellule d'origine **18**
1.3.1.1 Modèles de classification selon des algorithmes de clustering hierarchisé **19**
1.3.1.2 Modèles avec score de prédiction linéaire **20**
1.3.1.3 Impact pronostique **21**
1.3.2 Groupe GC : Anomalies moléculaires fréquentes, impact pronostique et conséquences thérapeutiques **21**
1.3.2.1 BCL2 ..... **21**
1.3.2.2 BCL6 ..... **22**
1.3.2.3 MYC **22**
1.3.2.3.1 Mécanismes de dérégulation *22*
1.3.2.3.2 Intérêt pronostique *23*
1.3.2.3.3 Relation entre translocation du gène MYC et expression IHC *24*
1.3.2.4 Dérégulations épigénétiques liées au gène EZH2 ..... **25**
1.3.3 Groupe ABC : Anomalies moléculaires fréquentes, impact pronostique et conséquences thérapeutiques **26**
1.3.3.1.1 MUM1/IRF4 ..... *26*
1.3.3.1.2 Activation de la voie NF-κB *26*
1.3.3.1.1 Activation de la voie PI3K/AKT/mTOR *27*
1.4 Démarche diagnostique anatomopathologique **28**
1.4.1 Enjeux autour du matériel tumoral **28**
1.4.2 Étape morphologique **28**
1.4.2.1 DLBCL NOS (*Not otherwise specified*) **28**
1.4.2.2 Lymphomes B de haut grade (HGBL) **29**
1.4.3 Étape immunohistochimique **30**
1.4.3.1 Affirmer l'appartenance des cellules tumorales à la lignée B **30**
1.4.3.2 Confirmer le caractère agressif du lymphome **30**
1.4.3.3 Éliminer les diagnostics différentiels **30**
1.4.3.4 Détermination de la cellule d'origine **30**
1.4.3.4.1 Intérêt *30*
1.4.3.4.2 Algorithme de Hans *31*
1.4.3.4.3 Autres algorithmes immunohistochimiques *32*
1.4.3.4.4 Controverses autour de l'IHC *33*
1.4.3.4.4.1 Généralités sur les limites de l'IHC aux différentes étapes analytiques 33
1.4.3.4.4.2 Des données contradictoires sur la valeur pronostique de l'immunohistochimie *33*
1.4.3.4.4.3 Concordance entre les différents algorithmes *34*
1.4.3.4.5 Synthèse sur l'apport de l'immunohistochimie dans la détermination de la cellule d'origine *34*
1.4.3.5 Rechercher un phénotype double-expresseur MYC+ BCL2+ **34**
1.4.3.5.1 Définition *34*
1.4.3.5.2 Valeur pronostique *35*
1.4.4 Étape cytogénétique : Recherche de réarrangements des gènes MYC, BCL2 et BCL6 ..... **35**
1.4.4.1 Valeur pronostique du caractère Double-Hit **36**
1.4.5 Relations entre phénotypes double expresseur, double hit et classification selon la cellule d'origine : implications diagnostiques **36**
1.4.6 Synthèse sur l'intégration conjointe des données morphologiques et cytogénétiques selon la révision 2016 de l'OMS **38**
1.5 Étape moléculaire: nouvelles méthodes de détermination de la cellule d'origine **38**

1.5.1 nCounter® Nanostring Technologies **38**
1.5.1.1 Principe de la méthode nCounter® **38**
1.5.1.2 Application dans les DLBCL pour la détermination de la cellule d'origine : Lymph2Cx **39**
1.5.2 RT MLPA **40**
1.5.2.1 Aspects techniques **40**
1.5.2.1.1 Extraction *40*
1.5.2.1.2 Étape de Reverse transcriptase *40*
1.5.2.1.3 Principes du design des amorces *40*
1.5.2.1.4 Hybridation – Ligation – Amplification- Migration *41*
1.5.2.1.5 Analyse sur la plateforme en ligne *42*
1.5.2.1.6 Panel de 14 gènes *42*
1.5.2.2 Validation de la RT-MLPA dans la classification selon la cellule d'origine **42**
1.5.2.2.1 Concordance avec les techniques de Gene Expression Profiling *43*
1.5.2.2.2 Concordance avec l'algorithme de Hans en immunohistochimie *43*
1.5.2.2.3 Application au matériel FFPE *43*
1.5.2.3 Intérêt pronostique **43**
1.5.2.4 Limites de la RT-MLPA **44**
1.5.2.4.1 Hétérogénéité tumorale et micro-environnement *44*
1.5.2.4.2 Stabilité des *ARN* *44*
1.5.2.5 Conclusion sur la RT-MLPA **44**
1.6 Aspects cliniques et prise en charge thérapeutique des DLBCL **45**
1.6.1 Présentation clinique **45**
1.6.2 Stadification **45**
1.6.3 International prognostic index (IPI) **45**
1.6.3.1 Définition **45**
1.6.3.2 Impact pronostique **45**
1.6.4 Prise en charge thérapeutique **46**
1.6.4.1.1 Bilan pré-thérapeutique *46*
1.6.4.1.2 Historique *46*
1.6.4.1.3 Standard actuel et réponse thérapeutique *47*
1.6.4.1.4 Perspectives thérapeutiques *47*
1.7 Question posée **48**
2 PATIENTS ET MÉTHODE **49**
2.1 Schéma et objectifs de l'étude **49**
2.2 Patients **49**
2.2.1 Sélection des patients **49**
2.2.1.1 Critères d'exclusion **49**
2.2.2 Recueil de données cliniques **50**
2.3 Examen anatomo-pathologique **50**
2.4 RT-MLPA **51**
2.4.1 Technique **51**
2.4.1.1 Extraction ARN **51**
2.4.1.2 Étape de Reverse Transcriptase **51**
2.4.1.3 MLPA **51**
2.4.1.3.1 Hybridation-Ligation-Amplification *51*
2.4.1.3.2 Électrophorèse capillaire *52*
2.4.2 Analyse **52**
2.4.2.1.1 Critères de qualité de la technique *52*
2.4.2.1.2 Traitement des données *52*
2.5 Analyses statistiques **54**
3 RÉSULTATS **55**
3.1 Flow chart des patients inclus et matériel sélectionné **55**
3.2 Caractéristiques anatomo-pathologiques des groupes IHC CD10+MUM1- CD10+MUM1+ **56**
3.3 Caractéristiques cliniques des groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+ **57**
3.4 Objectif principal : classification COO en RT-MLPA des groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+ **58**
3.4.1 Validation de l'étape pré-analytique **58**
3.4.2 Résultats des analyses dans les conditions pré-analytiques recommandées **58**
3.5 Profils moléculaires des groupes CD10+MUM1-/CD10+MUM1+ et des groupes GC/ABC/ZG définis en RT MLPA **61**
3.5.1 Comparaison des groupes IHC CD10+MUM1- CD10+MUM1+ **61**
3.5.1.1 Niveaux d'expression en ARN des 14 gènes du panel **61**

3.5.1.2 Gènes d'intérêt pour la classification COO 61
3.5.1.3 Gènes d'intérêt pronostique MYC et BCL2 62
3.5.2 Comparaison des groupes GC et ABC en terme d'expression des ARN IRF4 et MYC 63
3.6 Profils cliniques évolutifs 65
3.6.1 Cohorte globale 65
3.6.1.1 PFS et OS 65
3.6.1.2 Influence du score IPI sur la survie 65
3.6.1.3 Influence du phénotype DE en IHC sur la survie 66
3.6.2 Groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+ 66
3.6.2.1 PFS et OS 66
3.6.3 Groupes GC, ABC et ZG en RT-MLPA 67
3.6.3.1 PFS et OS 67
4 DISCUSSION 68
4.1 Comparaison des cas CD10+MUM1+ de notre cohorte avec les données de la littérature 68
4.2 Conséquences pratiques de cette reclassification 68
4.3 Comparaison des profils d'expression ARN en RT MLPA et protéine en IHC de MYC et BCL2. 70
4.4 Les limites de la RT-MLPA 71
4.5 Vers une intégration en routine de la RT-MLPA 71
4.6 Limites et perspectives de notre étude 72
5 BIBLIOGRAPHIE 73

Liste des figures

• Figure 1: Classification des néoplasies lymphoïdes matures B à grandes cellules selon la révision 2016 de l'OMS 12
• Figure 2: Organisation morphologique et fonctionnelle d'un centre germinatif (adapté de Basso et al).... 14
• Figure 3: Programmes transcriptionnels dans le centre germinatif aux différentes étapes de maturation des éléments lymphoïdes B (extrait de Baso et al) 15
• Figure 4: Démembrement moléculaire par clustering hiérarchisé des DLBCL sur puce Lymphochip (extrait de Alizadeh et al)..... 19
•Figure 5: Démembrement moléculaire par clustering hiérarchique des DLBCL sur puce Lymphochip (extrait de Rosenwald et al)..... 20
•Figure 6: Mécanismes géniques pouvant impliquer MYC et impact sur l'expression de l'ARNm et la protéine MYC. (extrait de Sesques et Johnson)..... 23
•Figure 7: Nombre d'études ayant un impact sur l'OS selon la présence d'une translocation de MYC, BCL2 ou BCL6. (Adaptée de s résultats de Schimdt-Hansen et al)..... 23
•Figure 8: Sensibilité et spécificité de différents seuils de positivité de l'IHC MYC pour la prédiction d'un réarrangement du gène MYC (MYC-RA) (extrait de Wang et al)..... 24
• Figure 9: Altérations moléculaires en lien avec le groupe GC (adaptée de Basso et al) 25
•Figure 10: Altérations moléculaires en lien avec le groupe ABC (adaptée de Basso et al) 27
• Figure 11: Principales cibles thérapeutiques potentielles en cours d'exploration dans les DLBCL (adaptée de Chiappella et al)..... 27
•Figure 12: Caractéristiques cytologiques des différents types de DLBCL : (A) centroblastique : noyau rond ou ovalaire avec nucléole périphérique. (B) immunoblastique : noyau rond ou ovalaire avec nucléole central unique proéminent. (C) anaplasique : cellules et noyaux de taille et contours variables avec pléomorphisme marqué.(HES 40x)..... 29
• Figure 13: Morphologie des DLBCL NOS (A), Burkitt-like (B) et Blastoïde (C)..... 29
•Figure 14: Algorithme de Hans..... 31
• Figure 15: Exemple d'immumarquages positifs avec les anticorps CD10 BCL6 MUM1 : marquage membranaire du CD10 et nucléaire de BCL6 et MUM1 (seuil de positivité >30% de cellules tumorales marquées)..... 31
•Figure 16: Construction des principaux algorithmes publiés (adaptée de Coutinho et al) 32
•Figure 17: Nombre d'études retrouvant ou non un impact pronostique sur l'OS des algorithmes de Hans et Choi (Adaptée des résultats de Schimdt-Hansen et al))..... 33
• Figure 18: FISH en interphase avec sondes break-apart -translocation de BCL2 (à gauche) et MYC (à droite) 35
• Figure 19: Diagramme de Vann faisant apparaître les fréquences des hyper-expression et réarrangements de MYC, BCL2, isolées et associées (Double Hit (DH) et Double Expresseurs (DE)) et schématisant leurs rapports mutuels..... 36
• Figure 20: Diagramme de Vann schématisant les rapports entre DLBCL double-hit, double-expresseurs et la classification selon la COO (extrait de Friedberg JW) 37
• Figure 21: Résumé des modifications de la révision 2016 de la classification OMS (extrait de Swerdlow et al) 38
•Figure 22: Principe de nCounter® Nanostring Technologies (Adaptée du guide de Nanosting Technologies) 39
• Figure 23: Principe de construction du couple de sondes de MLPA..... 41
• Figure 24: Principe de la RT-MLPA (adaptée du guide MRC Holland par Mareschal et al)..... 41
• Figure 25: Valeur pronostique de la classification GC/ABC en RT-MLPA (extrait de Mareschal et al)..... 43
• Figure 26: Stade Ann Arbor, International Prognostic Index et performance status (adaptée de Tilly et al) 46
• Figure 27: Prise en charge des DLBCL (adaptée des recommandations de l'ESMO)..... 47
• Figure 28: Probabilité de classification dans les groupes GC (courbe rouge), ABC (courbe bleue) et ZG (zone grise) selon le score RT-MLPA 53
• Figure 29: Profil d'expression selon le panel 14 ARN d'un DLBCL de type GC..... 53
• Figure 30: Profil d'expression selon le panel 14 ARN d'un DLBCL de type ABC 53
• Figure 31: Profil d'expression selon le panel 14 ARN d'un DLBCL de type ZG..... 54
• Figure 32: Flow Chart..... 55
• Figure 33: Morphologie et immunophénotype de DLBCL NOS CD10+MUM1- et CD10+MUM1+ (40x)... 56
• Figure 34: IHC MYC et BCL2..... 56
• Figure 35: Scores en RT-MLPA et classification GC (partie gauche), ZG (partie centrale) ABC (partie droite) de chaque patient CD10+MUM1- (ligne en vert) CD10+MUM1+ (ligne en rouge) 59
• Figure 36: Reclassement des cas CD10+MUM1- et CD10+MUM1+ dans les groupes GC ABC ZG

selon les données moléculaires de la RT-MLPA..... 60
•Figure 37: Niveaux d'expression normalisée en RT-MLPA des 14 ARN cibles pour chaque patient du groupe CD10+MUM1- (en vert) CD10+MUM1+ (en rouge) 61
• Figure 38: Expression de IRF4 dans les groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+ 62
• Figure 39: Différence du niveau d'expression des ARN MYC dans les groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+..... 62
• Figure 40: Corrélation entre les niveaux d'expression de MYC en IHC et RT-MLPA..... 63
• Figure 41: Niveaux d'expression d'IRF4 dans les groupes GC/ABC/ZG définis par la RT-MLPA..... 64
• Figure 42: niveaux d'expression des ARN MYC dans les groupes les groupes GC/ABC/ZG définis en RT-MLPA..... 64
• Figure 43: OS et PFS dans la cohorte globale..... 65
•Figure 44: OS et PFS selon l'IPI 65
• Figure 45: PFS et OS selon le phénotype DE en IHC..... 66
• Figure 46: PFS et OS des groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+ 66
• Figure 47: PFS et OS des groupes GC/ABC/ZG définis en RT-MLPA..... 67
•Figure 48: Propositions d'approches diagnostiques pour l'intégration de la RT-MLPA en routine dans la détermination de la COO..... 70

Liste des abréviations :

- **ABC :** *Activated B-Cell like*
- **CFD** *cellules folliculaires dendritiques*
- **COO :** *Cell Of Origin* / cellule d'origine
- **CSH :** cellules souches hématopoïétique
- **DLBCL** : *Diffuse large B cell lymphoma* - lymphomes B diffus à grandes cellules
- **FFPE** : f*ormalin-fixed paraffin-embedded* - matériel fixé au formol et inclus en paraffine
- **GC** : *Germinal Center B-cell like*
- **GEP** : *Gene Expression Profiling* - profil d'expression génique
- **HGBL :** *High Grade B cell Lymphoma* - lymphome B de haut grade
- **Ig :** immunoglobulines
- **IHC** : immunohistochimie
- **NOS** : *not otherwise specified* – sans autre spécification
- **OS :** *Overall survival* **–** survie globale
- **OMS** : organisation mondiale de la santé
- **PFS :** *Progression Free Survival* **–** Survie sans progression
- **PLC :** progéniteurs lymphoïdes communs
- **R-CHOP** : Rituximab (R) Cyclophosphamide (C) Doxorubicine (H) Vincristine (O) prédnisolone (P)
- **RT MLPA** : *Reverse transcriptase Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
- ***ZG :*** zone grise

1 INTRODUCTION

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) représentent 30 à 40 % des lymphomes non Hodgkiniens. Malgré les progrès thérapeutiques remarquables avec notamment l'avènement de l'anticorps monoclonal anti-CD20 Rituximab dans les années 2000, un tiers des patients restent réfractaires d'emblée ou rechutent précocement. Cette réponse thérapeutique , hétérogène, peu prévisible est à l'origine de nombreux travaux de recherche dédiés notamment à l'identification de sous groupes pronostiques et biologiques de DLBCL. Ces dernières années, les efforts se sont focalisés sur l'identification de signatures moléculaires et/ou voies de signalisation spécifiques.

En 2000, l'analyse moléculaire du profil d'expression génique (GEP) des DLBCL à partir des puce à ADN (*Microarray*) à permis de distinguer deux groupes selon le concept de cellule d'origine (*Cell Of Origin* ou COO). Sont définis le type centro-germinatif (*Germinal Center B-cell like ou GC*) et le type activé (*Activated B-Cell like ou ABC*), chacun présentant un profil clinique évolutif particulier et des anomalies moléculaires spécifiques représentant des cibles thérapeutiques potentielles. Cependant l'applicabilité en routine des techniques de GEP, considérées comme le g*old standard,* reste limitée du fait de leur complexité et de leur coût.

En 2004, Hans décrit un algorithme en immunohistochimie (IHC) ciblant des marqueurs de type centro germinatif (CD10 et BCL6) et un marqueur de cellule B activée (MUM1) permettant d'approcher simplement en routine diagnostique cette classification COO. Cependant la concordance est imparfaite entre ces deux approches IHC et moléculaire, et ne semble pas reproduire la valeur pronostique spécifique de chacun des groupes de façon consensuelle entre les études. De plus, l'approche IHC produit des profils discordants exprimant à la fois un marqueur centro-germinatif et un marqueur de cellule B activée (CD10+ MUM1+). Ce profil, considéré comme GC selon l'algorithme de Hans, est relativement peu étudié dans la littérature.

Récemment, de nouvelles techniques d'étude de l'expression des ARN ont été décrites comme la *Reverse transcriptase Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (RT-MLPA), Cette dernière présente une excellente concordance avec les méthodes de référence sur puce à ADN et est utilisable en routine clinique du fait d'un faible coût et d'une applicabilité sur matériel fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE).

Cette étude analyse comparativement deux groupes de DLBCL de profil GC CD10+ MUM1- et CD10+ MUM1+ en fonction de leurs caractéristiques anatomo-cliniques et moléculaires par la technique de RT-MLPA afin de préciser la COO dont ils dérivent respectivement.

1.1 Classification OMS et épidémiologie

La classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) des hémopathies (1) repose sur les mêmes principes que ceux définis en 1994 par la *revised european american lymphoma* (REAL) (2) . Il s'agit d'un processus intégré, synthèse des données cliniques, morphologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires associées à l'identification de la cellule équivalente dans son versant physiologique.

La révision 2016 de la classification OMS (3), actuellement en vigueur, enrichit la classification OMS 2008 de nouvelles entités provisoires ou définitives à la lumière des derniers résultats de la biologie moléculaire. La classification des néoplasies lymphoïdes matures B de haut grade selon la révision 2016 de l'OMS est présentée dans la Figure 1.

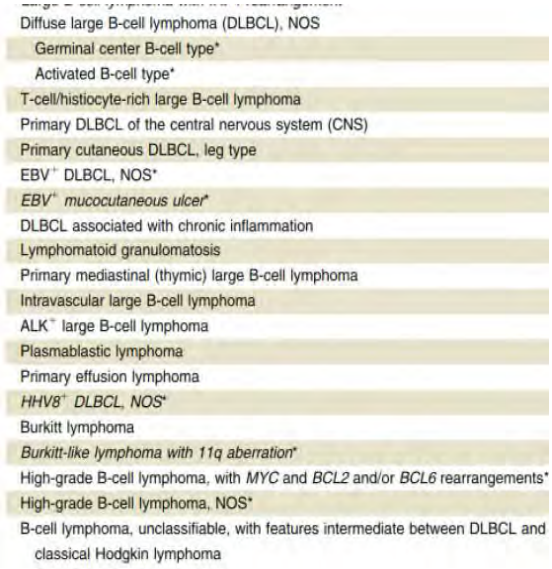


Figure 1: Classification des néoplasies lymphoïdes matures B à grandes cellules selon la révision 2016 de l'OMS

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) représentent 30 à 40% des lymphomes non hodgkiniens en occident avec une incidence annuelle en Europe estimée à 3,8/100.000. En France le nombre de nouveaux cas par an est estimé à 4000 (4,5). La progression de l'incidence annuelle de 3 à 4 % par an depuis les années 1970 en Amérique du nord notamment n'est que partiellement expliquée par l'évolution des classifications, des techniques diagnostiques et de l'effet du VIH et de l'immunodépression acquise (6) (7).

L'âge médian au diagnostic est de 69 ans. Les jeunes adultes et les enfants peuvent être concernés (8).

L'étiologie reste inconnue dans l'immense majorité des cas. Les facteurs de risques reconnus à ce jour sont les antécédents familiaux de lymphome, un terrain d'auto-immunité, l'exposition à des agents chimiques (9,10) (11), le virus d'Epstein Barr (1), le virus de immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'hépatite C (VHC). L'état d'immunodépression constitutionnel ou acquis est également un facteur favorisant, responsable d'entités particulières de DLBCL pouvant être associées à l'EBV et potentiellement sensibles à une restauration de l'immunité (9,12).

D'autres agents, actuellement non identifiés, sont suspectés de participer à la lymphomagénèse comme l'atteste un léger sur-risque de développement de lymphome B non Hodgkinien chez les patients transfusés (13).

La distinction est faite entre les DLBCL sans autre néoplasie lymphoïde sous-jacente, dits *de novo*, et ceux résultant de la transformation d'une lymphopathie B de bas grade ou d'un lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire, dits secondaires. Parmi les DLBCL, le type not otherwise specified (NOS) est de loin le plus fréquent(14) .

1.2 Lymphopoïèse B

Les lymphocytes B sont parmi les acteurs clés de la réponse immunitaire adaptative grâce à leur capacité remarquable de réponse spécifique à une grande diversité d'antigènes. Ils sont le support de la réponse immunitaire humorale, à l'origine de la synthèse des immunoglobulines (Ig) exprimés sous forme de récepteur de cellule B à la membrane cellulaire (B cell receptor ou BCR) ou sous forme soluble (anticorps) ciblés contre un antigène unique. La spécificité et la diversité de la réponse immunitaire adaptative est sous-tendue par la richesse du répertoire d'Ig dont les mécanismes sont détaillés dans cette partie **(15–17)**.

La lymphopoïèse B est un processus de maturation/différenciation des lymphocytes B, caractérisé par une expression-disparition séquentielle de facteurs de transcription et marqueurs de surface, lesquels permettent d'identifier le stade de maturation de la cellule B.

1.2.1 Étapes médullaires de différenciation

La maturation/différenciation des lymphocytes B à partir de cellules souches hématopoïétique (CSH) a lieu dans la moelle hématopoïétique localisée dans l'épiphyse des os longs et des os plats.

La première étape est la différenciation de CSH en progéniteurs lymphoïdes communs (PLC) caractérisés par l'expression du CD19, CD79, CD10, CD34 et CD45RA et ILR7. A ce stade, les gènes des Ig non encore réarrangés, sont en configuration germinale (stade pro-B). L'évolution vers un lymphocyte pré-B passe par les réarrangements successifs des gènes des chaînes lourdes des Ig (phénomène de recombinaison VDJ). Ces phénomènes hautement aléatoires donnent naissance à un lymphocyte doté d'un pré-BCR. Le passage au stade de lymphocyte pré-B est également marqué par l'expression du CD20 et du CD22 puis du réarrangement des gènes des chaînes légères des immunoglobulines IgK et IgL par recombinaison VJ. Les chaînes légères sont indispensables à la formation d'un BCR fonctionnel caractérisant le stade de lymphocyte B immature.

Ces lymphocytes B immatures exprimant un BCR constitué d'une IgM et d'une chaîne légère réarrangée quittent la moelle osseuse, passent dans la circulation sanguine et terminent leur différenciation dans la rate.

Cette étape splénique permet au lymphocyte B immature d'acquérir une IgD de surface, devenant ainsi un lymphocyte B naïf mature fonctionnel co-exprimant une IgM et une IgD de surface. Durant cette étape splénique a lieu également l'élimination de lymphocytes B immatures rendus anergiques après contact avec un auto-antigène et l'élimination de ceux ayant subi un réarrangement non fonctionnel des gènes des Ig.

Les lymphocytes B matures naïfs migrent ensuite vers les zones B des organes lymphoïdes secondaires pour former les follicules primaires. La rencontre directe entre un lymphocyte B et son antigène spécifique est un événement mathématiquement exceptionnel en soi lorsque l'on met en rapport le nombre de lymphocytes B circulants et l'importante variété du répertoire des Ig. Cette contrainte est résolue par l'action des cellules présentatrices d'antigène (CPA) representé par les cellules folliculaires dendritiques, les monocytes, les macrophages, ou les lymphocytes B activés qui mettent à disposition les antigènes dans les organes lymphoïdes secondaires.

1.2.2 Maturation des cellules B dans le centre germinatif

Dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglion lymphatique, tissu lymphoïde associé aux muqueuses, rate) les follicules primaires se transforment en follicules secondaires avec formation d'un centre germinatif en réponse à un stimulus antigénique.

Ce centre germinatif est la structure fonctionnelle offrant l'environnement permettant aux lymphocytes B naïfs spécifiques d'un antigène de proliférer et de diversifier leur BCR afin de produire des anticorps de haute affinité (18,19) . Ce processus aboutit à la formation de lymphocytes B spécialisés en cellule B mémoire, en immunoblaste ou en plasmablaste-plasmocyte (15,16) (Figure 2 et Figure 3) .

Le centre germinatif est entouré d'un manteau de lymphocytes B naïfs IgM et IgD+, associés à des lymphocytes T CD4+, des cellules folliculaires dendritiques (CFD) et des macrophages. Il se divise en deux zones: une zone sombre et une zone claire, morphologiquement et fonctionnellement distinctes.

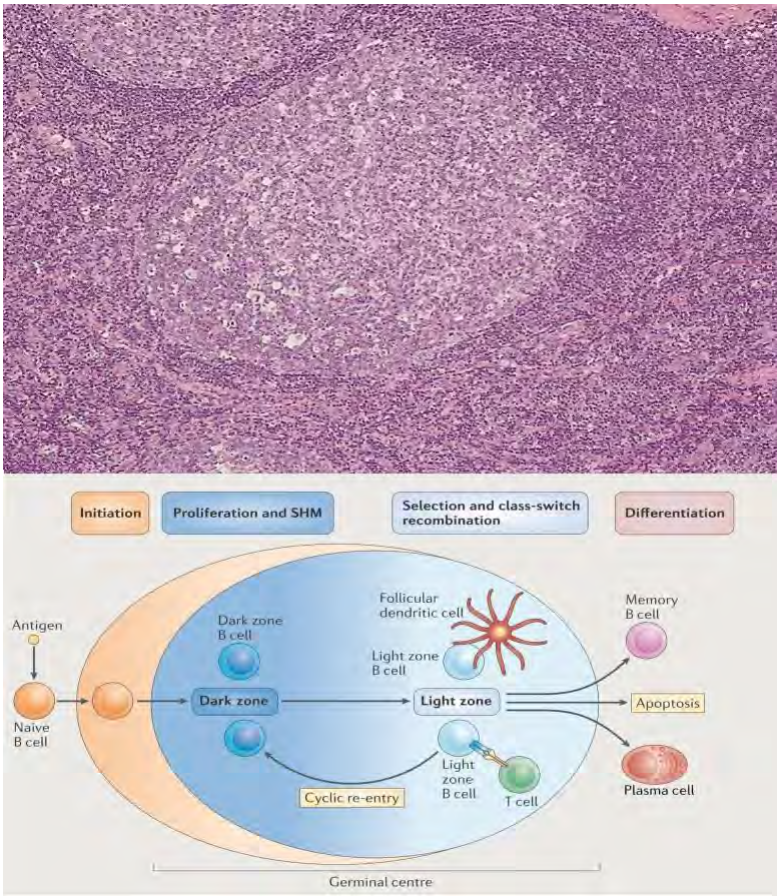


Figure 2: Organisation morphologique et fonctionnelle d'un centre germinatif *(adapté de Basso et al)*

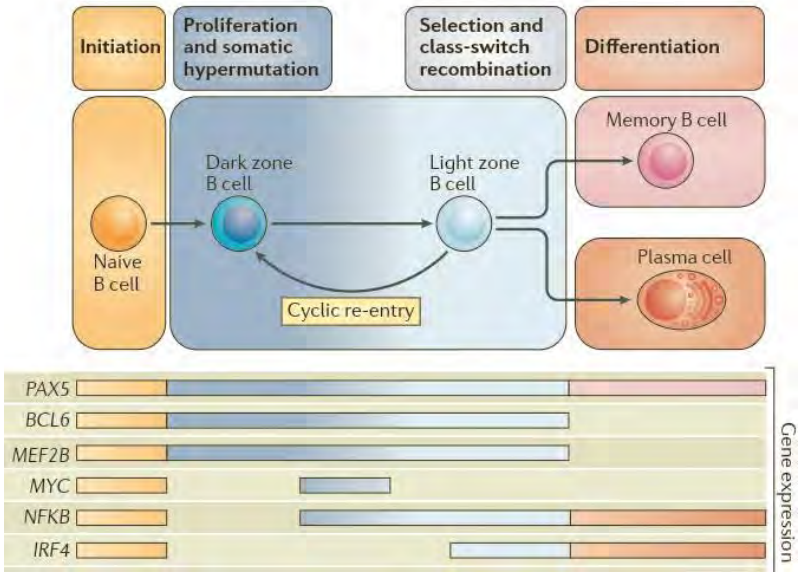


Figure 3: Programmes transcriptionnels dans le centre germinatif aux différentes étapes de maturation des éléments lymphoïdes B *(extrait de Baso et al)*

1.2.2.1 Zone sombre du centre germinatif

L'initiation de la maturation dans le centre germinatif et la formation de la zone sombre est dépendante de nombreux modulateurs de la transcription. Le lymphocyte B naïf stimulé par un antigène spécifique pénètre dans la zone sombre du centre germinatif et se multiplie pour donner des centroblastes. Ceux-ci subissent alors le processus d'hypermutation somatique (mutations ponctuelles sur les régions variables des gènes des chaînes lourdes et légères des Ig participant à la production d'Ig de haute affinité). Durant ce processus, les centroblastes deviennent des centrocytes.

Le rôle physiologique des facteurs les plus importants du fait de leur rôle dans la lymphomagénèse sont revus dans cette partie.

1.2.2.1.1 CD10

CD10 est une endopeptidase membranaire codée par le gène MME jouant un rôle dans la maturation et la différenciation des éléments B. Son expression est précoce dès le stade de PLC. En dehors des éléments lymphoïdes, il est exprimé dans les cellules du stroma endometrial, les hépatocytes et les cellules épithéliales gastriques et coliques. Le CD10 possède une fonction suppression de tumeur par la stabilisation de PTEN(20) .

1.2.2.1.2 MYC

La protéine MYC est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de 10% du génome (21). Les gènes cibles jouent un rôle dans la prolifération et la croissance cellulaire en agissant sur le métabolisme cellulaire, les télomérases et la réplication de l'ADN.

MYC est indispensable dans la phase précoce de formation des centres germinatifs, son expression est ensuite réprimée, sous l'action de BCL6, dans les centroblastes de la zone sombre (22). Son expression concerne également quelques éléments B de la zone claire destinés à une ré-entrée dans la zone sombre.

1.2.2.1.3 BCL6

BCL6 est un inhibiteur de la transcription contrôlant un vaste réseau de gènes impliqués dans la formation des centres germinatifs. Son niveau d'expression est régulé négativement par son interaction avec son propre promoteur.

BCL6 se lie à des séquences d'ADN spécifiques permettant le recrutement d'histones desacetylases offrant un environnement favorable au remodelage de l'ADN et inhibant les voies d'activation et de différenciation des cellules B. Il est donc essentiel pour limiter la différenciation post centro-germinative, maintenir les éléments B dans le centre germinatif et offrir l'environnement favorable au phénomène d'hyper-mutation somatique dans la zone sombre. De plus, au cours des phénomènes physiologiques de recombinaison génétique, il inhibe l'action apoptotique de TP53 (16).

Par ailleurs, bien que son rôle soit principalement répresseur, il peut indirectement promouvoir l'expression d'un gène par la modulation de microARN.

BCL6 est également exprimé par les lymphocytes T Helper folliculaires CD4+, nécessaires à la formation et au maintien des centres germinatifs ainsi qu' à la différentiation des lymphocytes B en plasmocytes et cellules B mémoires.

1.2.2.1.4 EZH2

Le gène EZH2 (histone methyltransferase enhancer of zeste homologue 2) code pour une enzyme impliquée dans la fonction des histones. L'expression de ce gène favorise la prolifération des cellules B des centres germinatifs et prévient leur différenciation. Il joue un rôle physiologique dans la répression de la transcription des gènes de la Cycline D1 et IRF4.

1.2.2.2 Zone claire du centre germinatif

Morphologiquement, la différenciation en centrocytes caractérise la zone claire. Les centrocytes exprimant une Ig de haute affinité (processus infructueux le plus souvent, engendrant une mort de la majorité des centrocytes par apoptose) poursuivent leur sélection dans la zone claire du centre germinatif .

Cette sélection a lieu grâce aux interactions entre les centrocytes et les CFD. Seuls les centrocytes qui auront capté l'antigène présenté à la surface de la CFD grâce au BCR hautement affin, puis présenté à sa surface sous la forme d'un complexe HLA-II/Ag, recevront un signal de survie. A l'issue de ce processus de sélection, les centrocytes exprimant le plus de complexes

HLA-II/Ag interagissent avec les lymphocytes T Helper folliculaires CD4+. Cette interaction entraîne l'expression de signaux de survie, et le processus de différenciation en plasmocytes ou en lymphocyte B mémoire (23)

1.2.2.2.1 Voie NF-Kb

Le BCR et d'autres signaux impliquant le récepteur CD40, TNFSF13B et des TLR (Toll-like receptors) entraînent une cascade d'événements impliquant les voies MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K (phosphoinositide 3-kinase) aboutissant à l'activation de la voie NF-κB.

La voie NF-κB active IRF4 qui inhibe l'expression de BCL6 favorisant ainsi la différenciation post germinative.

1.2.2.2.2 MUM1/iIRF4

La protéine MUM1 codée par le gène IRF4 est un régulateur du développement des cellules B. L'expression d'IRF4 est déclenchée dans les centrocytes par l'activation du BCR et de la voie NF-kB en aval. Les souris MUM1/IRF4 déficientes présentent des troubles dans la formation des centres germinatifs et des anomalies de maturation des plasmocytes (24,25) . MUM1 est exprimée par les cellules B mémoires, les plasmocytes et les lymphocytes B du centre germinatif destinés à une différenciation plasmocytaire.

1.2.2.3 BCL2

Le gène BCL2 a un rôle anti-apoptotique. Il est physiologiquement exprimé dans les cellules lymphoïdes pré-B de la moelle et les éléments B naïves du manteau. Il n'est pas exprimé dans les lymphocytes B du centre germinatif.

1.3 Lymphomagénèse des DLBCL

La synthèse d'un répertoire exhaustif de BCR/Ig est associée à une contrepartie pathologique. Elle conduit à un risque d'anomalies à l'échelle chromosomique et génique. Ces altérations peuvent entraîner un échappement aux mécanismes physiologiques impliqués dans la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire. La sensibilité du locus du gène des chaînes lourdes des Ig aux translocations est une conséquence des phénomènes de recombinaison et d'hyper-mutation somatique physiologiques.

La pathogénie précise des DLBCL reste relativement mal comprise. Certains mécanismes sont bien identifiés mais ne sont pas universellement partagés par tous les DLBCL. Les translocations et autres mécanismes aboutissant à la surexpression pathologique d'oncogènes tels que BCL2 et/ou MYC et/ou BCL6 dans un contexte d'hypermutation somatique jouent un rôle clé dans la lymphomagénèse de même que d'autres mécanismes plus récemment décrits comme les modifications épigénétiques (1,26).

Cette partie détaille le rationnel du démembrement moléculaire des DLBCL, selon la cellule d'origine (COO) et les principales anomalies impliquées dans la lymphomagénèse pour chacun des groupes de DLBCL.

1.3.1 Démembrement moléculaire: classification selon la cellule d'origine

La classification OMS cherche à déterminer la contrepartie cellulaire normale de la cellule tumorale. Elle est basée sur une approche globale anatomo-clinique et moléculaire permettant de mettre en évidence de grandes catégories de néoplasies lymphoïdes. Elle définit chacune des entités tumorales en fonction de la présentation clinique, des caractéristiques morphologiques, phénotypiques, cytogénétiques et moléculaires et cherche à identifier des sous-groupes pouvant bénéficier d'approches thérapeutiques spécifiques. Cette approche tire profit de l'essor de la génomique et de la transcriptomique à haut débit depuis les années 2000.

Les études sur le profil d'expression génique (*Gene Expression Profiling* ou GEP) ont permis, par l'analyse quantitative et qualitative des ARN dans les DLBCL, de mettre en évidence une hétérogénéité moléculaire que l'hétérogénéité clinique laissait présager et d'identifier ainsi des sous-groupes de DLBCL distincts.

1.3.1.1 Modèles de classification selon des algorithmes de clustering hierarchisé

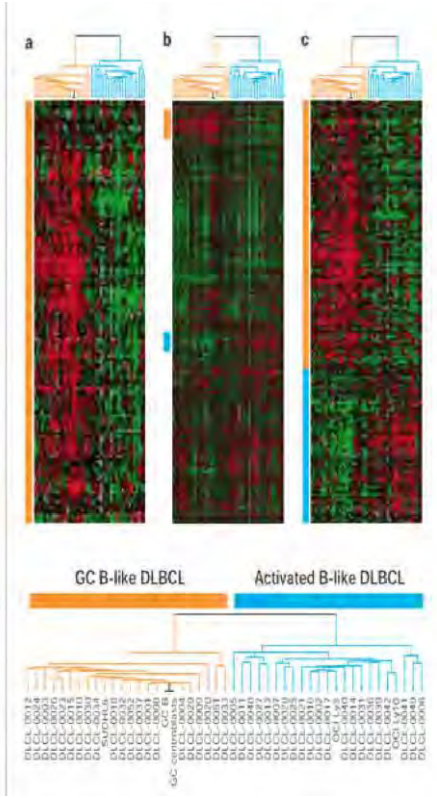
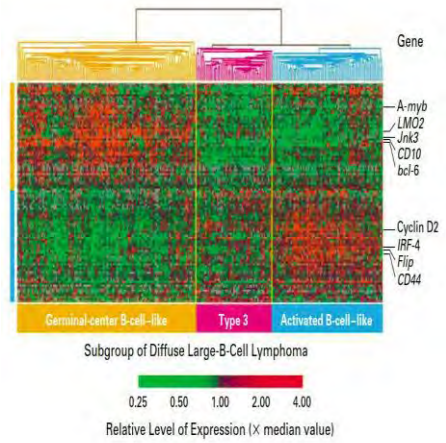


Figure 4: Démembrement moléculaire par clustering hiérarchisé des DLBCL sur puce Lymphochip *(extrait de Alizadeh et al)*

L'analyse exhaustive du transcriptome publiée par Alizadeh et al(27) en 2000 est considérée comme l'étude princeps dans le domaine. Réalisée sur 40 échantillons de matériel congelé et étudiant l'expression de 17 856 ARN cibles contenus dans une puce Lymphochip, elle a permis, grâce à l'utilisation d'un algorithme de clustering hiérarchique, d'isoler deux sous-groupes de DLBCL *de novo*.

Tout d'abord un groupe dont le profil moléculaire se rapproche de celui des cellules B du centre germinatif (*germinal centre B-cell profile* ou GCB) et un second groupe qui présente un profil moléculaire se rapprochant de cellules B activées par des IgM in vitro (*activated B-cell profile* ou ABC).



Oncogenic Abnormality	Germinal-center B-cell–like	Type 3	Activated B-cell–like
	no. of samples		
c-rel amplification	17	0	0
bcl-2 t(14;18)	26	0	0

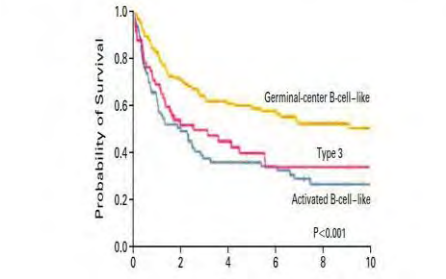


Figure 5: Démembrement moléculaire par clustering hiérarchique des DLBCL sur puce Lymphochip *(extrait de Rosenwald et al)*

En 2002, Rosenwald et al(28) confirment et précisent cette classification par puce Lymphochip sur 240 échantillons congelés également par une méthode de clustering hiérarchique en se basant sur une sélection plus restreinte de 670 gènes au départ, réduite finalement à 16 gènes à valeur discriminante élevée. Les auteurs identifient l'existence d'un type 3 dit «inclassable» ne pouvant être défini ni GC ni ABC.

1.3.1.2 Modèles avec score de prédiction linéaire

Wright et al(29) confirment le démembrement en déterminant les groupes GC et ABC par une méthode originale sur des puces pan-transcriptomiques développées par Affymetrix appliquées sur un matériel tumoral congelé.

Les auteurs sélectionnent 14 gènes hautement discriminants en excluant les gènes potentiellement confondant associés à la prolifération et à la réponse immune de l'hôte.

Un modèle statistique basé sur un score de prédiction linéaire (*Linear predictor score* ou LPS*)* fait l'originalité de cette méthode qui assigne à chaque cas une probabilité d'appartenir à un groupe moléculaire. La construction de ce modèle passe par une phase dite d'apprentissage: l'expression de chaque gène est comparée dans les deux groupes GC et ABC préalablement définis par la méthode de référence selon un clustering hiérarchique.

1.3.1.3 Impact pronostique

L'importance de ces études moléculaires à haut débit réside surtout dans le fait que cette classification moléculaire a été associée à une relevance clinique. En effet, la stratification en deux groupes selon le profil d'expression des ARN par Alizadeh et al(27) s'est avérée pronostique sur la cohorte des 40 patients étudiés. Le groupe GC présentait un taux de survie globale (OS) à 5 ans significativement supérieur à celui du groupe ABC après polychimiothérapie à base d'anthracycline (OS à 5 ans : GC 76% et ABC 16%) (30).

L'impact pronostique de cette classification a été validé sur des cohortes plus larges de patients traités par polychimiothérapie à base d'anthracyclines : l'étude de Rosenwald et al(28) sur 240 patients. et l'étude de Wright et al(29) sur 274 patients rapportant des OS à 5 ans respectivement de 60% et 62% pour le groupe GC et 35% et 26% pour le groupe ABC.

Ces résultats sont retrouvés à l'ère du Rituximab comme l'ont montré Lenz et al(31) (OS à 5 ans: GC 80% et ABC 50%) , Barrans et al(32) (Hazard Ratio OS GC=0,57) et Scott et al(33) (OS à 5 ans: GC 78% et ABC 56%).

1.3.2 Groupe GC : Anomalies moléculaires fréquentes, impact pronostique et conséquences thérapeutiques

1.3.2.1 BCL2

BCL2 a été décrit en 1987 par Tsujimoto et al (34) comme l'anomalie oncogénique caractérisant le lymphome folliculaire via la translocation t(14;18) juxtaposant le gène BCL2 au promoteur du gène IGH et responsable d'une surexpression aberrante de BCL2. Il s'agit, dans la lymphomagénèse, d'un événement précoce mais insuffisant à lui seul.

L'hyper-expression de la protéine BCL2 est observée dans 24 à 80% des DLBCL. L'importante disparité des fréquences relevées dans la littérature est liée aux seuils choisis(35). Récemment, dans le cadre de l'essai prospectif LNH03-6B du LYSA rapporté par Petrella et al(36) chez des patients de plus de 65 ans traités par R-CHOP, il est mis en évidence une influence pronostique défavorable en terme d'OS de l' hyper-expression isolée de BCL2 dans les DLBCL non-GC. Ce résultat, à l'ère du R-CHOP, concorde avec celui de Hans et al(30) , avant le développement du Rituximab, qui ne validait la valeur pronostique de BCL2 que dans le groupe non-GC. En 2017, Tsuyama et al(35) , dans un travail visant la construction d'un score IHC pour BCL2, mettent également en évidence cet impact défavorable indépendamment de l'IPI et de la cellule d'origine sur une cohorte conséquente de 456 patients.

La translocation de BCL2 est observée de façon générale dans 24% des DLBCL (37) . Cette anomalie est décrite comme spécifique du groupe GC dans l'étude de Rosenwald et al (28) et plus récemment par Staiger et al(38) . Elle est retrouvée plus fréquemment dans le groupe GC dans d'autres études tel que celle de Scott et al(33) (46% pour GC Vs 6% pour ABC) et Johnson et al(37) (43% pour GC Vs 17% pour ABC). La translocation isolée de BCL2 n'est que rarement retrouvée comme ayant un impact pronostique dans la littérature comme le montre la revue systématique de Schmidt-Hansen et al(39) modélisée dans la Figure 7.

Des inhibiteurs de BCL2 sont développés tel que le Venetoclax/ABT-199 dans les lymphomes lymphocytiques(40) et actuellement explorés dans les DLBCL (essais de phase I/II).

1.3.2.2 BCL6

En situation pathologique d'accumulation de dommages sur l'ADN, l'expression aberrante de BCL6 limite l'action apoptotique salvatrice de TP53.

Cette hyper-expression de BCL6 concerne 60 à 85% des DLBCL (30,33). Elle peut résulter de plusieurs mécanismes parmi lesquels des mutations du domaine d'autorégulation du gène, des mutations de la machinerie épigénétique et des translocations impliquant comme partenaire les gènes des chaînes lourdes des Ig (IGH) et non-IGH (16). En effet jusqu'à 30 % des DLBCL présentent des translocations de la région 3q27 impliquant le gène BCL6 (1,41).

L'hyper-expression de BCL6 n'est pas un facteur pronostique à l'ère du R-CHOP d'après les résultats de Culpin et al(42).

Selon Ye et al(43) l'hyper-expression de BCL6 est plus souvent observée dans le groupe GC que ABC (75,8 % Vs 48,1%). Après ajustement sur l'expression de BCL2, aucun impact pronostique n'est mis en évidence. La translocation de BCL6 est quant à elle plus souvent observée dans le groupe ABC que GC (30 % Vs 17,5%).

1.3.2.3 MYC

1.3.2.3.1 Mécanismes de dérégulation

La translocation de MYC, décrite en 1982 par Taub et al(44), est un des premiers mécanismes oncogéniques identifié en lien avec la lymphomagénèse d'origine centro-germinative. La translocation t(8;14) associant le gène MYC à IGH est classiquement associée au lymphome de Burkitt.

La translocation de MYC concerne de 7 à 21% des DLBCL ; elle est surtout retrouvée dans le groupe GC (74%) (45,46) .

D'autres mécanismes dérégulateurs sont décrits.

- mutations, pouvant entraîner soit une résistance des ARNm à la dégradation soit une baisse de leur expression

- amplifications

- mécanismes dépendant des micro-ARN.

La Figure 6 extraite de l'article de Sesques et Johnson(47) synthétise ces mécanismes. L'impact de ces différents mécanismes à la fois sur l'expression protéique de MYC et sur l'expression des ARNm est variable et a des répercussions en pratique clinique.

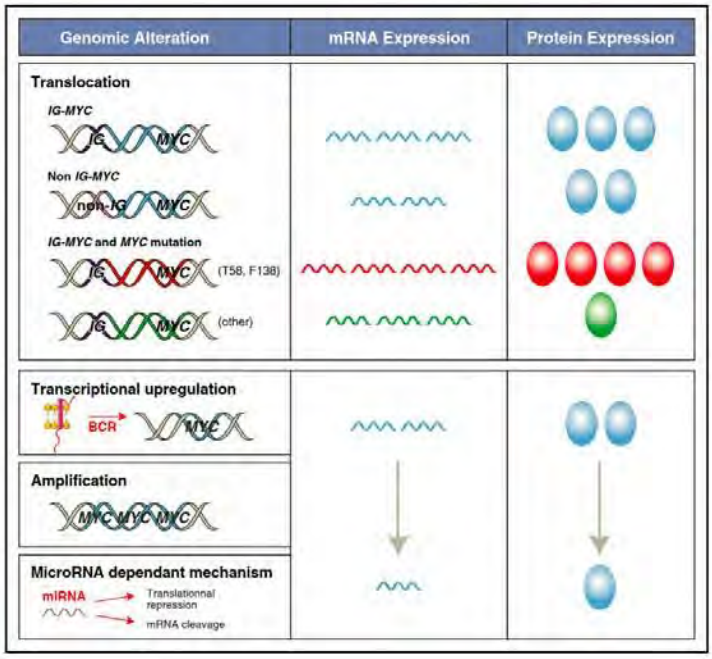


Figure 6: Mécanismes géniques pouvant impliquer MYC et impact sur l'expression de l'ARNm et la protéine MYC.
(extrait de Sesques et Johnson)

1.3.2.3.2 Intérêt pronostique

Les réarrangements de MYC dans les DLBCL traités par R-CHOP, sans prendre en compte la classification en fonction de la cellule d'origine, sont souvent associés à un pronostic défavorable dans les études rapportées. Barrans et al(48) retrouvent une OS à 2 ans de 35% dans les DLBCL réarrangés Vs 61%. Ce résultat concorde avec celui rapporté par Savage et al(49) concernant 135 patients avec une OS à 5 ans de 33% dans le groupe des DLBCL avec translocation Vs 72% en l'absence de translocation de MYC. Dans ces études, cette anomalie était fréquemment associée à des présentations cliniques agressives. Concernant l'impact des translocations isolées de MYC, BCL2 ou BCL6, la Figure 7 est adaptée des résultats de la revue systématique de Schimdt-Hansen et al (39) .

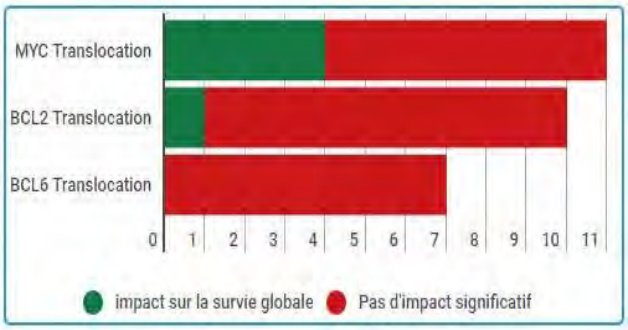


Figure 7: Nombre d'études ayant un impact sur l'OS selon la présence d'une translocation de MYC, BCL2 ou BCL6.
(Adaptée de s résultats de Schimdt-Hansen et al)

Récemment Copie-Bergman et al(45) ajoutent un degré de complexité à l'analyse du réarrangement de MYC. En effet l'impact défavorable n'est observé que dans les cas où le gène partenaire de MYC est un gène des immunoglobulines. Cette situation est observée dans 48% des cas de réarrangement de MYC.

Par ailleurs, l'hyper-expression isolée de MYC en IHC n'est pas un facteur de mauvais pronostic, et de façon étonnante, il s'agit d'un facteur de bon pronostic dans l'étude de Johnson et al (37) .

1.3.2.3.3 Relation entre translocation du gène MYC et expression IHC

La relation entre la translocation de MYC et l'expression de MYC en IHC est variable selon le seuil choisi.

L'hyper-expression de MYC en IHC, selon Johnson et al(37), est observée dans 33% des DLBCL. Un tiers de ces cas MYC+ en IHC présente une translocation du gène MYC.

Selon Horn et al(41), 69% des réarrangements de MYC en FISH sont associés à une hyper-expression de MYC définie avec un seuil de 40%.

En 2012, Green et al(50) proposent d'utiliser un seuil de ≥70% et obtiennent sur leur cohorte une sensibilité de 100 % et une spécificité de 93 % dans la prédiction d'un réarrangement. Kluk et al(51) montrent qu'avec des seuils de 80%, 60% et <50% en IHC, la translocation est mise en évidence dans respectivement 54,7%, 14,9% et 4,7%. Le seuil de 50% offre une sensibilité de 87,8% avec une spécificité faible de 36 %.

Allant à l'encontre de ces auteurs, en 2015 Wang et al(52) ne recommandent pas l'IHC comme substitut à la cytogénétique du fait d'une sensibilité et d'une spécificité qualifiées de médiocres peu importe le seuil choisi (Figure 8).

Récemment, Colomo et al(53) se sont attachés à rechercher d'autres marqueurs prédictifs de la présence d'une translocation de MYC telle que la négativité de LMO2 en IHC, performante particulièrement dans le groupe CD10+ (87 % de réarrangement de MYC).

MYC IHC$^+$			
% Cutoff	Total No.	MYC-RA (n = 32)	MYC-RA (Sensitivity) (%)
90	14	13	41
80	19	16	84
70	27	18	56
60	42	21	66
50	56	25	78
40	65	26	81
30	95	28	88
20	106	29	91
10	116	31	97
0	131	32	100

Figure 8: Sensibilité et spécificité de différents seuils de positivité de l'IHC MYC pour la prédiction d'un réarrangement du gène MYC (MYC-RA) *(extrait de Wang et al)*

Suivant les recommandation de la révision 2016 de l'OMS, le seuil de 40% de cellules tumorales positives en IHC définit les DLBCL MYC+. En pratique ce seuil incite, malgré les limites discutées ici, à rechercher un réarrangement du gène MYC en FISH.

1.3.2.4 Dérégulations épigénétiques liées au gène EZH2

Les facteurs jouant un rôle dans la régulation épigénétique peuvent être altérés. EZH2 est victime d'une mutation gain de fonction dans 22 % des DLBCL de type GC(54). L'expression de sa forme mutée en présence d'une dérégulation de BCL2 dans les cellules B de souris est associée au développement de lymphome (54).

Il s'agit d'une cible potentiellement sensible aux agents pharmacologiques tel que le Tazemetostat actuellement en cours d'exploration (55).

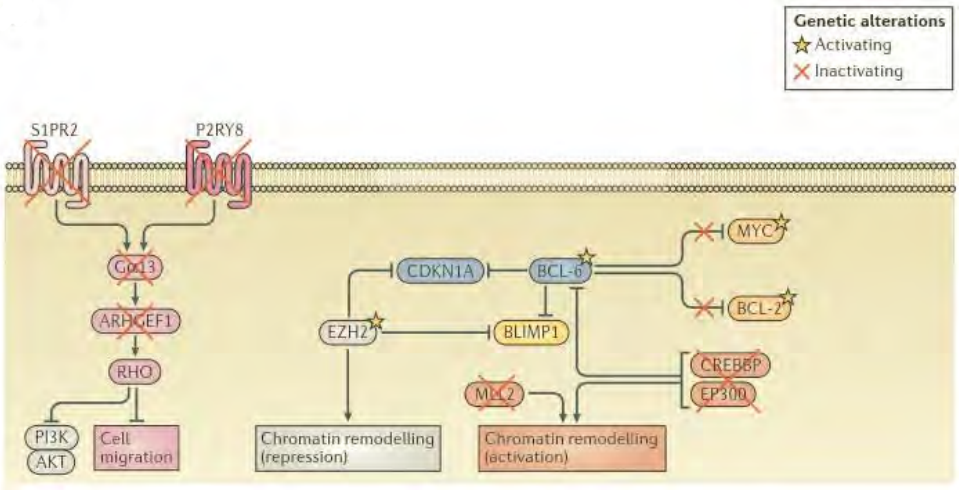


Figure 9: Altérations moléculaires en lien avec le groupe GC *(adaptée de Basso et al)*

1.3.3 Groupe ABC : Anomalies moléculaires fréquentes, impact pronostique et conséquences thérapeutiques

Le groupe ABC constitue un groupe d'intérêt du fait du pronostic péjoratif qui lui est associé et des drivers oncogéniques aujourd'hui identifiés. Les données de la littérature dans le domaine thérapeutique sur ce sujet sont en constante évolution; il s'agit d'un champ de recherche clinique dynamique et prometteur en terme de perspectives thérapeutiques.

1.3.3.1.1 MUM1/IRF4

Les DLBCL expriment MUM1 dans 51 à 75% des cas. En situation pathologique, cette expression peut être concomitante de celle de BCL6 (57% des cas) alors que ces deux protéines sont physiologiquement mutuellement exclusives (56,57) .

Prise isolément, l'expression de MUM1 est un facteur péjoratif selon Hans et al(30) (OS à 5 ans : 36% Vs 66% p=0,009). Ce résultat concorde avec celui de l'étude de Lu et al(58) sur une cohorte de 306 patients traités par immuno-chimiothérapie.

Cette valeur péjorative n'est pas confirmée par Culpin et al(42) , Berglund et all(59) ou Colomo et al(57) .

1.3.3.1.2 Activation de la voie NF-κB

Il s'agit d'un mécanisme essentiel dans la lymphomagénèse du groupe ABC. En effet, in vitro, l'inhibition de la voie NF-κB entraîne la mort des cellules lymphomateuses(60).

L'activation de la voie NF-κB trouve sa source dans une grande variété de mécanismes moléculaires ouvrant la voie d'un programme transcriptionnel favorisant la prolifération cellulaire.

Parmi ces mécanismes on retrouve l'activation chronique du BCR soit par des antigènes soit par des des mutation de CD79A/B (20%) co-facteur du BCR ; l'inactivation de TNFAIP3 (55%) ,), les mutations activatrices de CARD11(10 à 12%) et les mutations de MYD88 (15 à 30%) et l'intervention de protéines intermédiaires dont la tyrosine kinase de bruton (BTK) (15) (14).

D'un point de vue thérapeutique, l'Ibrutinib est une petite molécule se liant à BTK et inhibant son activité (61).

Le Lénalidomide est un immunomodulateur qui réprime la transcription de IRF4 aboutissant également à une réduction d'activité de la voie NF-kB (62).

L'action de NF-κB est inhibée par la protéine IkB. La phosphorylation de IkB par l'IkB kinase (IKK) permet par l'activation de la voie NF-κB. Le Bortezomib est un inhibiteur du protéasome qui prévient la dégradation de la protéine Ikb permettant le maintient de NF-kB dans sa forme inactive. Cet agent bloque par ailleurs la dégradation de régulateurs du cycle cellulaire pouvant expliquer le fait que cet agent sensibilise les cellules lymphomateuses à la chimiothérapie conventionnelle (63). Cependant les derniers résultats rapportés par Leonard et al(64) dans le cadre d'une étude de phase II randomisée portant sur les non-GC définis selon Hans ne montrent pas de bénéfice à l'ajout de Bortezomib au R-CHOP.

1.3.3.1.1 Activation de la voie PI3K/AKT/mTOR

Cette voie de signalisation, activée suite à la stimulation du BCR, concerne plus fréquemment les DLBCL ABC.

D'un point de vue thérapeutique, des inhibiteurs de la voie BCR/PI3K/AKT/mTOR sont l'objet d'essais cliniques portant sur les lymphomes B et plus particulièrement ceux de bas grade. Il s'agit notamment de l'Ibrutinib, inhibiteur de la kinase BTK recrutée lors de la stimulation du BCR, de l'Idelalisib, inhibiteur de la PI3Kinase (65) (66) et d'inhibiteurs de mTOR comme l'Everolimus (55).

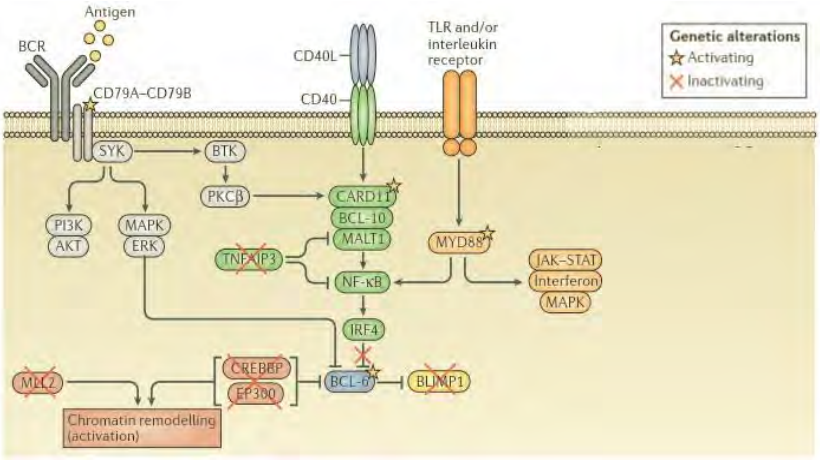


Figure 10: Altérations moléculaires en lien avec le groupe ABC *(adaptée de Basso et al)*

Les principales cibles thérapeutiques citées dans ce chapitre sont présentées dans la Figure 11 adaptée de Chiapella et al(63)

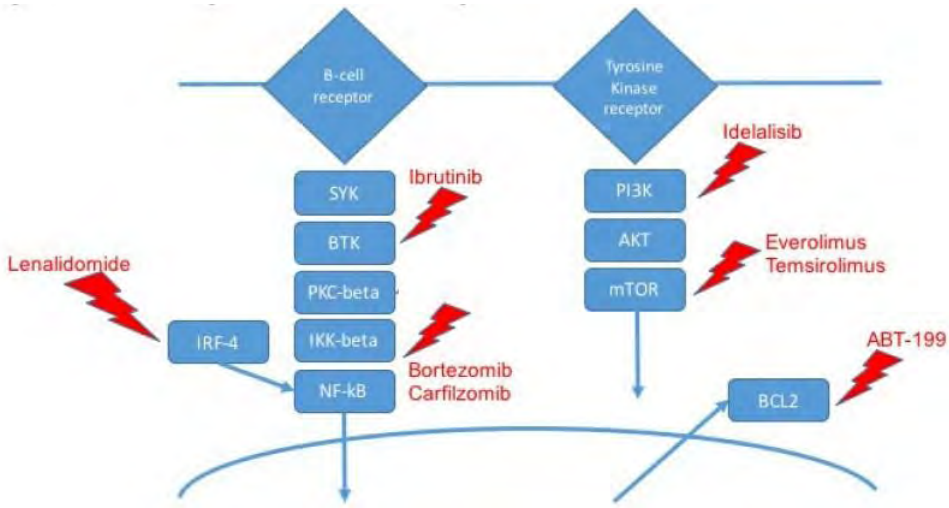


Figure 11: Principales cibles thérapeutiques potentielles en cours d'exploration dans les DLBCL *(adaptée de Chiappella et al)*

1.4 Démarche diagnostique anatomopathologique

Un plateau technique équipé pour entreprendre les investigations phénotypiques, cytogénétiques et moléculaires est indispensable pour poser un diagnostic complet de DLBCL et en préciser les facteurs pronostiques.

La diagnostic doit être validé dans un des 34 centres experts du réseau LYMPHOPATH maillant le territoire français. Ce réseau a été mis en place par l'Institut National du Cancer (INCa) en 2010 et impose une double lecture des cas de lymphome. Cette attitude est actuellement justifiée par une modification de la prise en charge dans 13% des cas suite à la relecture selon le rapport de l'INCa de 2015 (67) .

1.4.1 Enjeux autour du matériel tumoral

La biopsie chirurgicale d'une adénopathie ou d'une localisation tumorale extra-ganglionnaire est la méthode de référence préconisée dans les recommandations actuelles (10,68) pour la mise en œuvre de tout les moyens techniques pour un diagnostic précis. La biopsie à l'aiguille est une alternative lorsque l'approche chirurgicale est impossible.

Le développement des techniques de radiologie interventionnelle ces dernières années a permis l'obtention de matériel tumoral avec une moindre morbidité pour le patient au prix d'une quantité de matériel réduite pour le pathologiste et l'hématobiologiste. Cette quantité de matériel prélevé est un enjeu qui conditionne la bonne entreprise des analyses anatomo-pathologiques, cytogénétiques et moléculaires.

Le prélèvement est adressé à l'état frais afin de permettre la cryoconservation d'un échantillon à -80° pour les analyses moléculaires éventuelles. Ce conditionnement tissulaire reste en théorie la référence pour les analyses transcriptomiques et génomiques. Le reste du prélèvement est fixé dans un volume vingt fois supérieur de formol tamponné à 4%, fixateur garantissant l'accès à la majorité des analyses moléculaires.

1.4.2 Étape morphologique

Il s'agit d'une pathologie lymphoïde maligne caractérisée par une prolifération cellulaire d'architecture diffuse composée de grandes cellules au noyau volumineux au moins deux fois supérieur à celui d'un lymphocyte normal ou égal à la taille d'un noyau de celui d'un histiocyte. Plusieurs aspects morphologiques sont décrits.

1.4.2.1 DLBCL NOS (*Not otherwise specified*)

L'OMS reconnaît trois sous-types morphologiques parmi les DLBCL NOS(69) (Figure 12):

- Un type centroblastique (80%), lorsque plus de 90 % des cellules tumorales sont d'aspect centroblastique caractérisées par une grande taille, un noyau rond ou ovalaire en position centrale porteur de plusieurs nucléoles para-membranaires

- un type immunoblastique (10%) lorsque plus de 90 % des cellules tumorales sont de type immunoblastique caractérisées par une couronne cytoplasmique basophile plus large et un noyau légèrement excentré, porteur d'un nucléole proéminent.

- un type anaplasique (<10%) lorsque le pléomorphisme est marqué. (7)

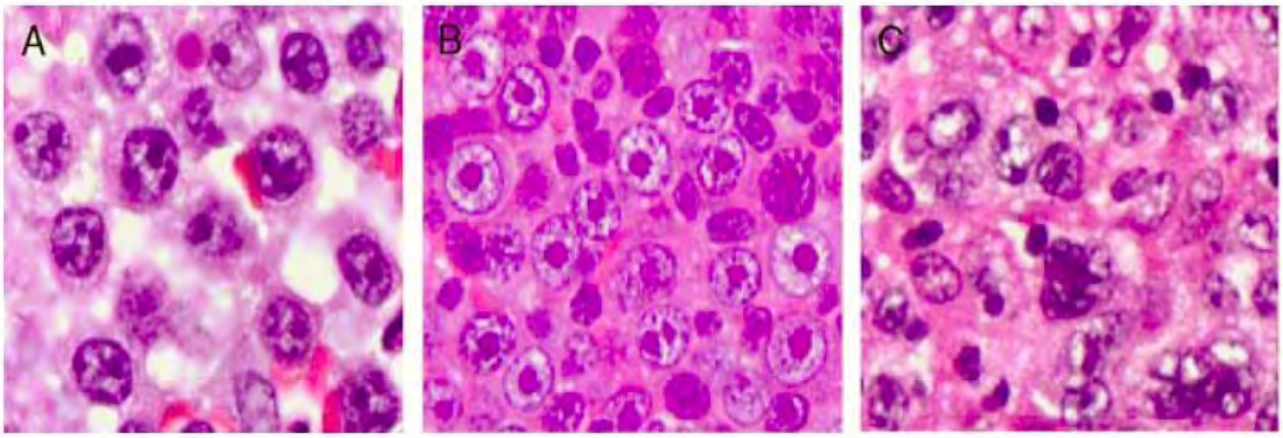


Figure 12: Caractéristiques cytologiques des différents types de DLBCL : (A) centroblastique : noyau rond ou ovalaire avec nucléole périphérique. (B) immunoblastique : noyau rond ou ovalaire avec nucléole central unique proéminent. (C) anaplasique : cellules et noyaux de taille et contours variables avec pléomorphisme marqué.(HES 40x)

La proportion de lymphocytes T réactionnels et d'histiocytes est variable. Si ces deux composantes cellulaires prédominent sur sur la population tumorale B, il s'agit alors d'un lymphome B riche en T/histiocytes, entité distincte des DLBCL NOS.

D'un point de vue pratique, la classification morphologique des DLBCL NOS selon les critères de l'OMS présente peu d'intérêt clinique bien que l'équipe allemande de Ott et al(70) rapporte, à travers l'essai RICOVER-60, que le sous-type immunoblastique est un facteur de mauvais pronostic, la classification selon la COO en IHC en étant dépourvue dans cette étude.

1.4.2.2 Lymphomes B de haut grade (HGBL)

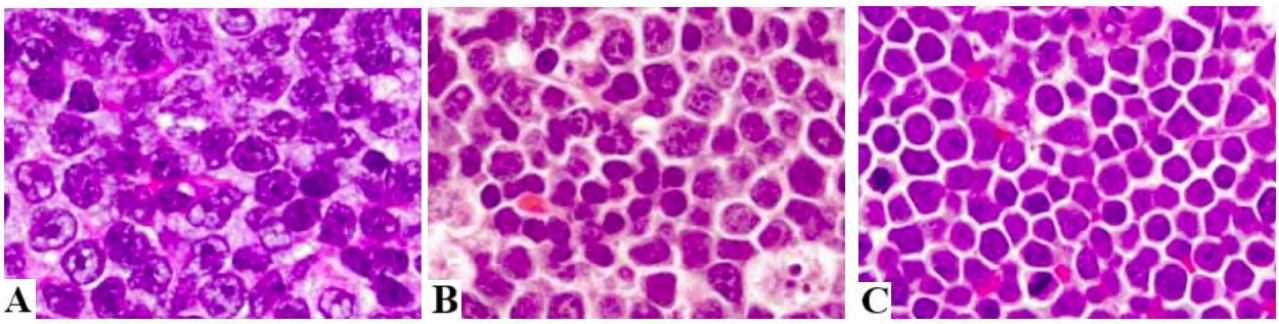


Figure 13: Morphologie des DLBCL NOS (A), Burkitt-like (B) et Blastoïde (C)

Dans la classification OMS 2016, la nouvelle entité lymphome B de haut grade (*High Grade B cell Lymphoma* ou HGBL), représente 5 à 10 % des DLBCL. Elle remplace les lymphomes B inclassables de morphologie intermédiaire entre un DLBCL et un lymphome de Burkitt (ou Burkitt-Like ou Burkitt atypique) et les DLBCL blastoïdes de la classification OMS 2008. Ce diagnostic répond à l'association de critères morphologiques et cytogénétiques particuliers.

Morphologiquement, les HGBL se caractérisent soit par une morphologie typique de lymphome de Burkitt avec un profil IHC et cytogénétique atypique (BCL2+, KI67 modéré) soit une morphologie équivoque ou intermédiaire entre un DLBCL NOS et un lymphome de Burkitt. Une morphologie équivoque ou intermédiaire se définit par un pléomorphisme cellulaire avec un mélange de cellules de tailles moyennes et grandes avec nucléoles proéminents. Il s'y associe de nombreuses mitoses, des cellules apoptotiques et des macrophages à corps tingibles dispersés réalisant un aspect de ciel étoilé, caractéristiques observées dans le lymphome de Burkitt.

Les HGBL peuvent présenter également une morphologie blastoïde avec des cellules de taille moyenne, d'aspect blastique avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Ces aspects imposent d'éliminer un lymphome lymphoblastique ou un lymphome du manteau dans une forme blastoïde.

1.4.3 Étape immunohistochimique

1.4.3.1 Affirmer l'appartenance des cellules tumorales à la lignée B

Les marqueurs B CD20, CD79a, PAX5 sont exprimés.

1.4.3.2 Confirmer le caractère agressif du lymphome

Outre la grande taille des cellules tumorales, l'index de prolifération évalué avec l'anticorps anti-Ki67 doit être supérieur à 40% (1).

1.4.3.3 Éliminer les diagnostics différentiels

Le CD5 est observé dans moins de 10 % des cas et impose d'éliminer un lymphome du manteau dans sa forme agressive par la recherche d'une expression de la cycline D1 en IHC. Par ailleurs, la positivité du CD5 est un facteur pronostique péjoratif selon certains auteurs(71).

En cas de morphologie blastoïde la négativité de marqueurs d'immaturité comme le Tdt doit être vérifiée pour éliminer un lymphome lymphoblastique.

Enfin, il est indispensable de vérifier la négativité du CD3, et de compléter éventuellement le panel IHC avec d'autres marqueurs T afin d'éliminer un lymphome T périphérique avec expression aberrante du CD20.

1.4.3.4 Détermination de la cellule d'origine

1.4.3.4.1 Intérêt

Le démembrement moléculaire par GEP ayant fait la preuve de sa pertinence clinique sur le plan pronostique et dans la perspective d'applications thérapeutiques le problème de la faisabilité en routine clinique s'est posé. Cette évolution explique que la classification selon la COO optionnelle dans la classification OMS 2008 est requise en 2016.

L'OMS reconnaît les difficultés de l'application des méthodes de référence en routine. Elle ajoute que l'IHC, selon l'approche algorithmique décrite par Hans, est tolérée dans l'attente du développement de nouvelles méthodes plus fiables. En effet, de façon générale, l'IHC est une technique ancillaire privilégiée car simple, de faible coût et pratiquée en routine dans les laboratoires d'anatomo-pathologie.

1.4.3.4.2 Algorithme de Hans

En 2004, Hans (30) est le premier à proposer une approche basée sur trois anticorps dont les cibles ont été choisies selon l'expression des ARNm associés aux groupes GC et ABC dans les études transcriptomiques. Cet algorithme reproduit la classification transcriptomique par puce *Lymphochip* avec une sensibilité de 71% pour le groupe GC et 88% pour le groupe non-GC tout en conservant sa valeur pronostique dans cette étude (10).

L'algorithme est basé sur l'expression des marqueurs centro-germinatifs CD10 et BCL6 et sur le marqueur post-germinatif MUM1. L'expression du CD10, BCL6 et MUM1 est respectivement de 30-60%, 60% et 35-65% dans les DLBCL. Les seuils d'expression retenus sont de 30% pour chacun des marqueurs. L'algorithme permet de définir un groupe GC et un groupe non-GC qui comprend en théorie le type ABC et le type 3 «inclassable» décrit par Rosenwald et al(28).

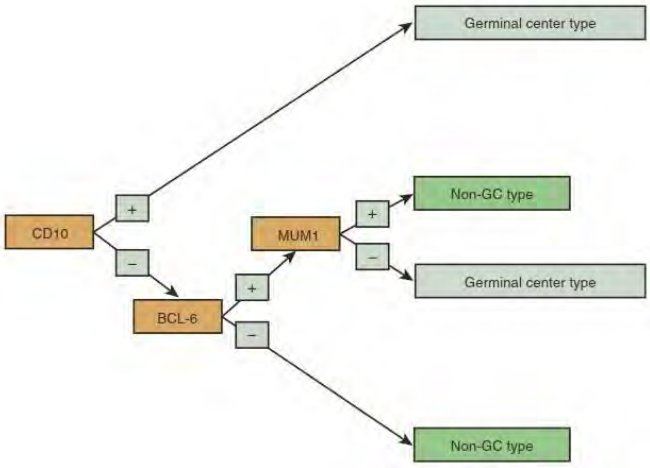


Figure 14: Algorithme de Hans

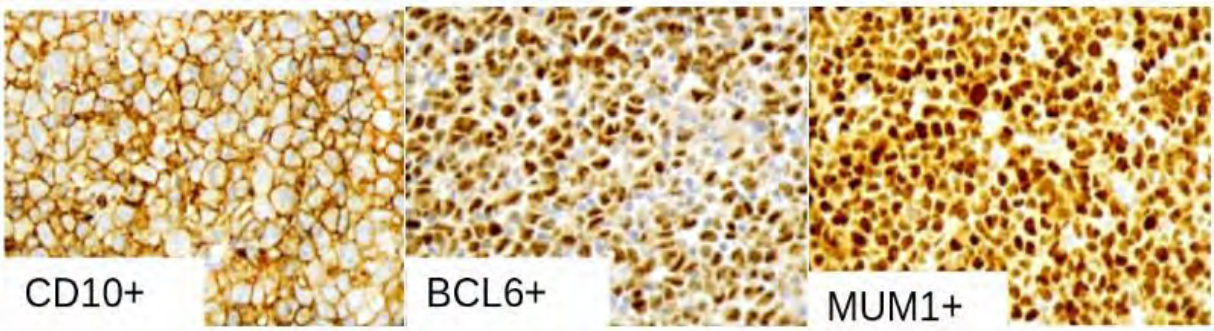


Figure 15: Exemple d'immumarquages positifs avec les anticorps CD10 BCL6 MUM1 : marquage membranaire du CD10 et nucléaire de BCL6 et MUM1 (seuil de positivité >30% de cellules tumorales marquées)

1.4.3.4.3 Autres algorithmes immunohistochimiques

De nombreux autres algorithmes basés également sur l'expression de marqueurs centro-germinatifs et post germinatifs ont été décrits par Nyman(72) , Muris (73), Choi (74), Tally(75) , Natkunam(18) Visco-Young(76) (Figure 16).

Leurs performances sont résumées dans le Tableau 1 adapté des résultats de l'étude de Meyer et al(75) comparant les différents algorithmes sur 262 échantillons, pour lesquels la cellule d'origine est définie sur puce Affymetrix U133+2.

L'algorithme de Choi, de description plus récente, est plus complexe et bénéficie de l'évolution technique des anticorps en IHC. Il prend en considération le facteur confondant que constitue la variabilité inter-observateur en définissant des valeurs-seuil adaptées. La concordance avec la classification transcriptomique sur puces Affymetrix revendiquée dans l'étude princeps est élevée de l'ordre de 93%; Cependant cette analyse a exclu les cas inclassables en transcriptomique (type 3) expliquant sans doute la discordance avec d'autres études.

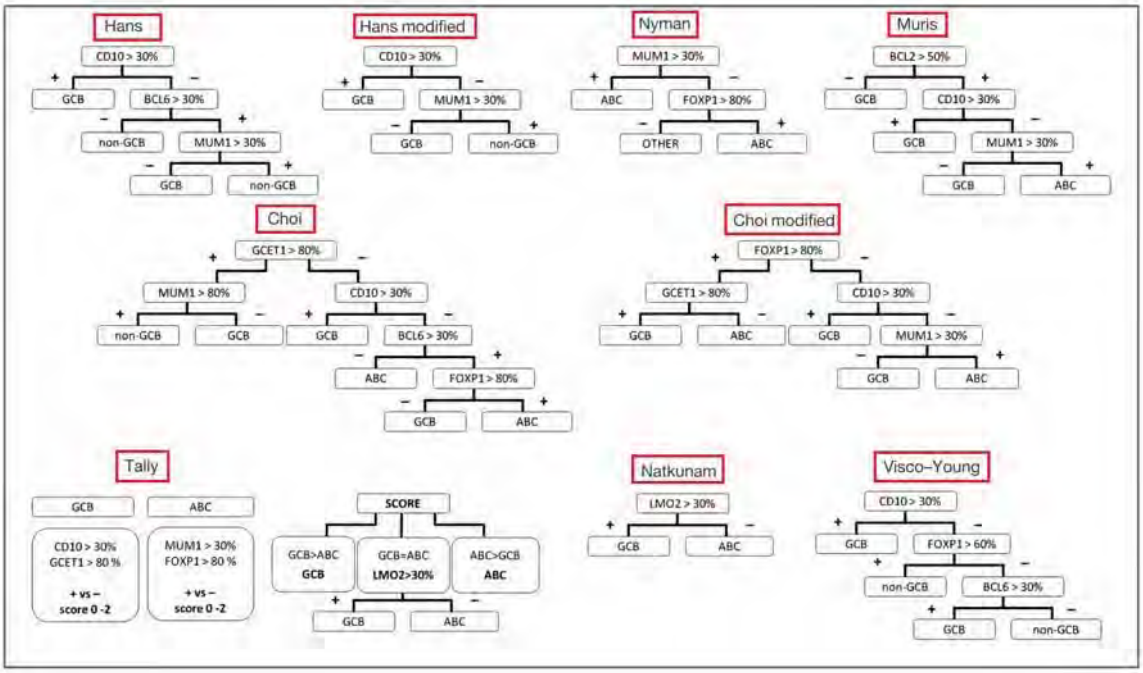


Figure 16: Construction des principaux algorithmes publiés *(adaptée de Coutinho et al)*

Algorithme	concordance GEP (%)	sensibilité (%)	spécificité (%)
Hans	86	82	90
Choi	87	85	89
Muris	77	99	54
Nyman	81	67	95
Natkunam	74	74	74
Tally	93	86	86

Tableau 1: Concordance des algorithmes IHC avec la technique de référence par puce Affymetrix pour la détermination de la COO *(Adapté de Meyer et al)*

1.4.3.4.4 Controverses autour de l'IHC

1.4.3.4.4.1 Généralités sur les limites de l'IHC aux différentes étapes analytiques

Un des principaux enjeux de l'IHC en routine reste la standardisation des techniques de laboratoire et la standardisation de l'analyse entre les pathologistes. Sur le plan pré-analytique, la qualité d'une IHC est dépendante du temps d'ischémie avant fixation et de la durée de fixation. La sensibilité des anticorps à la sous-fixation et la sur-fixation est variable et peut influer significativement sur le résultat comme l'ont montrés Engel et al (77). En post-analytique, il faut tenir compte de hétérogénéité tumorale spatiale et de la notion de seuil de positivité. Il persiste dans toute analyse d'IHC une variabilité inter-observateur.

1.4.3.4.4.2 Des données contradictoires sur la valeur pronostique de l'immunohistochimie

Pour l'algorithme de Hans, Ott et al(70,78) dans la cohorte prospective allemande RICOVER-60 en 2010 puis 2012, Guttierez et al(79) en 2011 et Castillo et al(80) en 2012 remettent en question sa valeur pronostique dans l'approche de la COO.

La revue systématique de Shmidt-hansen et al(39) de même qu'une large méta-analyse de Read et al(81) en 2015, montrent que les algorithmes de Hans et Choi apparaissent incapables de discriminer des groupes de pronostics différents de façon constante. La Figure 17 est construite à partir de la revue systématique de Shmidt-Hansen et al de 2017 faisant apparaître le nombre d'études, rapportant ou non, un impact significatif des algorithmes de Hans et Choi en terme d'OS.

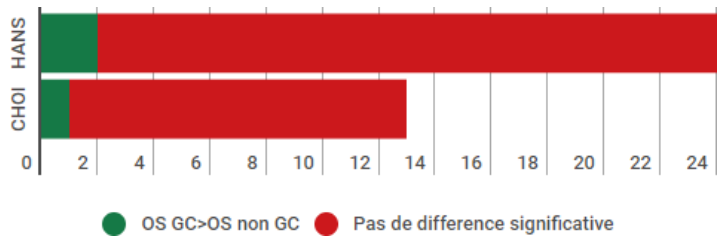


Figure 17: Nombre d'études retrouvant ou non un impact pronostique sur l'OS des algorithmes de Hans et Choi *(Adaptée des résultats de Schimdt-Hansen et al))*

Pourtant l'IHC bénéficie d'une confiance relative. En 2015 Nowakowski et al(82) ont recours à l'IHC pour cibler la thérapeutique sur le groupe non-GC dans un essai de phase II portant sur le Lenalidomide de même que Leonard et al(64) en 2017 au sujet du Bortezomib. Dans l'étude prospective récente du LYSA rapportée par Petrella et al(36), la classification de la cellule d'origine selon Hans chez les plus de 60 ans garde sa valeur pronostique.

1.4.3.4.4.3 Concordance entre les différents algorithmes

Coutinho et al(83) montrent sur une cohorte de DLBCL *de novo* que 9 des principaux algorithmes publiés ne sont concordants entre eux que dans seulement 4% des DLBCL GC et 21% des DLBCL non-GC. Par ailleurs, aucun des algorithmes n'a apporté d'information pronostique sur cette cohorte traitée par immuno-chimiothérapie.

1.4.3.4.5 Synthèse sur l'apport de l'immunohistochimie dans la détermination de la cellule d'origine

Malgré les efforts entrepris dans le domaine de la détermination de la COO en IHC, il n'y a pas de marqueur, unique ou en association, permettant une concordance parfaite avec les méthodes de référence et une reproduction constante de la valeur pronostique.

Ainsi des modifications thérapeutiques basées sur le statut GC ou non-GC défini en IHC, et en particulier dans les essais thérapeutiques prospectifs, ne sont pas recommandées par les conférences de consensus européennes les plus récentes (10,68,84) .

La méthode de référence reste donc le GEP initialement développé sur matériel congelé. Néanmoins, cette technique n'est pas utilisable en routine, pour des raisons technologiques, de coût mais aussi d'accès difficile voir impossible au matériel cryopréservé.

La révision 2016 de l'OMS accepte donc le recours à l'algorithme de Hans, du fait de sa corrélation avec les données des études transcriptomiques exhaustives, considérée comme raisonnable avec un taux d'erreur d'environ 20%.

Cette révision souligne cependant l'importance du développement de nouvelles méthodes moléculaires répondant à la nécessite de classer les DLBCL de façon plus fiable en routine dans la perspective de l'arrivée de nouvelles thérapeutiques ciblées.

1.4.3.5 Rechercher un phénotype double-expresseur MYC+ BCL2+

1.4.3.5.1 Définition

Les DLBCL double-expresseurs (DE) se définissent par l'hyper-expression en IHC de MYC et de BCL2 par les cellules tumorales. Les valeurs retenues pour MYC et BCL2, par la révision 2016 de la classification de l'OMS, sont respectivement de 40% et 50% (3).

La fréquence de ce phénotype varie entre 18 et 44 % dans la littérature en raison de l'utilisation de seuils de positivité différents (seuils de MYC variant de 40 à 70 % et BCL2 de 1 % à 70 % (47)).

Malgré ces seuils hétérogènes, la majorité des études soulignent que ce phénotype est plus souvent observé dans le groupe ABC que dans le groupe GC. L'étude la plus récente de Staiger et al(38) rapporte une fréquence de 33 % parmi les DLBCL ABC et 17 % parmi les DLBCL GC.

1.4.3.5.2 Valeur pronostique

Le mauvais pronostic associé au phénotype DE est mis en évidence par Green et al(85) (OS à 3 ans de 43% Vs 86%) et le groupe du British Columbia de Johnson et al(37) (Hazard Ration OS de 3,2 pour MYC+BCL2+, Vs 0,47 MYC+BCL2- Vs 1.6 MYC-BCL2-)

Ces résultats sont en accord avec ceux de Hu et al(86) (OS à 5 ans de 30% Vs 75%) qui précisent que l'évolution clinique plus agressive de ce phénotype est indépendante du statut ABC ou GC ; en effet, c'est l'enrichissement en lymphomes DE dans le groupe ABC qui pourrait expliquer le mauvais pronostic de ce groupe dans cette étude.

Plus récemment, l'analyse de deux grands essais prospectifs randomisés du *German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group* par Staiger et al(38) (essai RICOVER-60 avec patients de plus de 60 ans tout IPI confondus et essai R-MegaCHOEP avec patients de moins de 60 ans IPIaa 2,3) conclut à l'impact pronostique défavorable du caractère DE (avec les seuils préconisés par l'OMS). Cependant, à l'inverse de Hu et al, la valeur pronostique de la COO n'est confirmée qu'après exclusion des DLBCL DE (33).

Par ailleurs, dans l'essai prospectif de phase III LNH03-6B du LYSA récemment rapportés par Petrella et al(36) sur des patients âgés de plus de 60 ans, ce caractère pronostique péjoratif du phénotype DE n'est pas retrouvé (en utilisant les seuils préconisés par l'OMS).

1.4.4 Étape cytogénétique : Recherche de réarrangements des gènes MYC, BCL2 et BCL6

L'identification d'une double translocation MYC et BCL2 (80-90 %) ou MYC et BCL6 (10 à 20%) ou d'une triple translocation (MYC, BCL2 et BCL6, très rare) va définir un sous groupe de HGBL avec réarrangements (encore appelés double-hit (DH) ou triple hit) pour les différencier des lymphomes B de haut grade NOS (Figure 18).

Ces HGBL avec réarrangement représentent 6 à 14% des DLBCL (87).

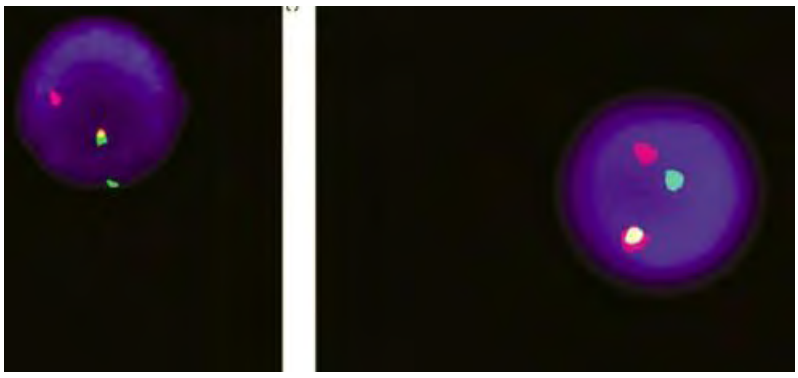


Figure 18: FISH en interphase avec sondes break-apart -translocation de BCL2 (à gauche) et MYC (à droite)

Contrairement au phénotype DE rencontré plus fréquemment dans les DLBCL de type ABC, ces réarrangements sont plus fréquemment rencontrée dans le groupe GC. Dans la cohorte de 45 DLBCL récemment rapportée par Moore et al (88), les DH sont dans 93% des cas de type GC et une hyper-expression en IHC de MYC (seuil >40%) est observée dans 76% des cas.

Staiger et al(38) montrent que les DH sont exclusivement représentés dans le groupe GC avec une fréquence de 10 à 14 % parmi les DLBCL.

1.4.4.1 Valeur pronostique du caractère Double-Hit

Depuis la première description de ce profil DH en 1999 par Macpherson et al (89), de nombreuses études rétrospectives ont associé ce profil à une atteinte du système nerveux central, une évolution agressive et une efficacité réduite du traitement standard par R-CHOP **(90–92)**. Ces éléments justifient la nécessité de la caractérisation en FISH et le développement d'essais prospectifs à la recherche de nouvelles approches thérapeutiques.

Deux grandes études récentes rapportées par Ye et al(43) et Copie-Bergman et al(45) soulignent que le caractère péjoratif est propre à la double translocation MYC et BCL2 et non MYC et BCL6, et que le partenaire de MYC doit être un gène de type Ig.

1.4.5 Relations entre phénotypes double expresseur, double hit et classification selon la cellule d'origine : implications diagnostiques

Les relations entre phénotypes DE, DH et classification COO sont complexes et parfois contradictoires en fonction des études.

Les fréquences pour MYC, BCL2 et BCL6, en terme d'expression en IHC et de réarrangements sont résumées dans la Figure 19 (1,37).

L'impact des translocations isolées de MYC, BCL2 BCL6 sur plan pronostique et la corrélation avec l'expression protéique en IHC ont été abordés dans les chapitres précédents.

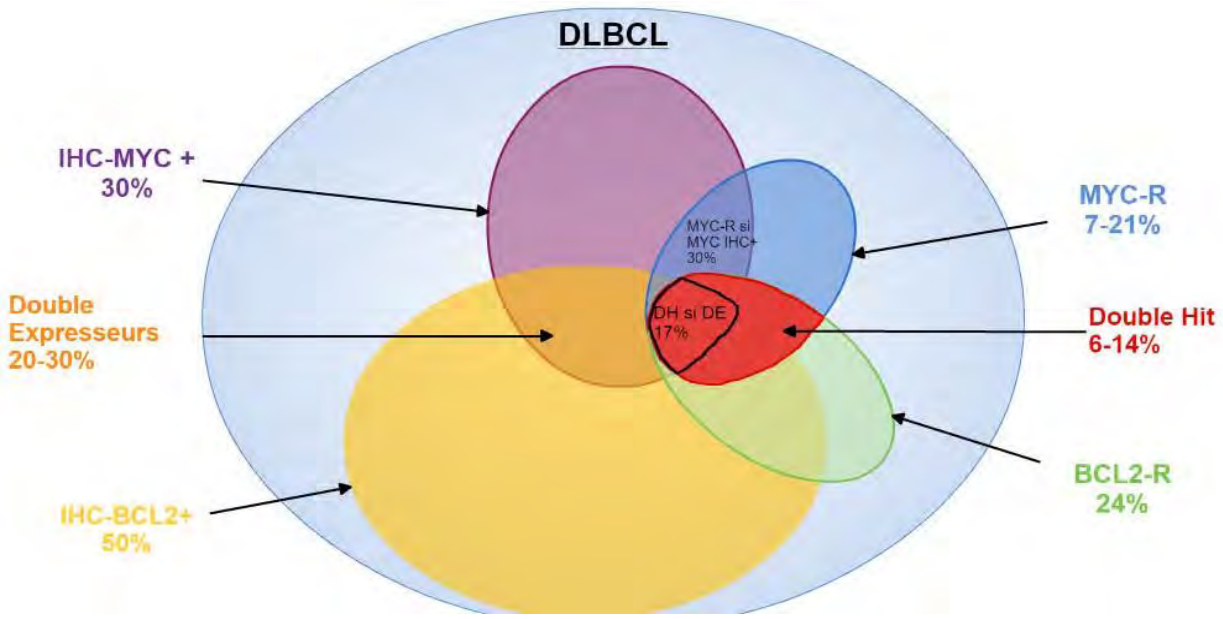


Figure 19: Diagramme de Vann faisant apparaître les fréquences des hyper-expression et réarrangements de MYC, BCL2, isolées et associées (Double Hit (DH) et Double Expresseurs (DE)) et schématisant leurs rapports mutuels

Les lymphomes DE sont DH dans moins de 20 % des cas, comme observé par de nombreux auteurs dont Green et al(85).

En revanche, 80 à 90 % des DH ont un phénotype DE (85,86,93).

En outre, pour ajouter à la complexité, le phénotype DH est plus souvent observé dans les lymphomes de type GC tandis que le phénotype DE est plus fréquent dans les lymphomes de type ABC (Figure 20).

Par conséquent ces deux phénotypes caractérisent deux groupes biologiques bien distincts qui ne se recoupent pas nécessairement.

Or, d'un point de vue clinique, il est important de reconnaître ces HGBL avec réarrangements dont le comportement est plus agressif et qui nécessitent un traitement spécifique. Cependant il n'existe actuellement pas de consensus concernant l'approche diagnostique à mettre en œuvre pour les identifier.

Deux stratégies peuvent être proposées pour l'exploration en FISH;

- Les contraintes économiques et pratiques peuvent inciter à adopter une stratégie ciblée mais en fonction d'un ou plusieurs critères qui restent à définir : phénotype DE, COO, morphologie ou présentation clinique?

- Une stratégie exhaustive offrant une étude FISH à tous les DLBCL.

La révision 2016 de l'OMS n'oriente pas vers une stratégie précise. De l'avis de certains experts tels que Swerdlow en 2014 et Friedberg en 2017 (93,94), la majorité des DH étant de type GC et surexprimant MYC en IHC, ce groupe peut constituer une cible prioritaire pour une étude en FISH.

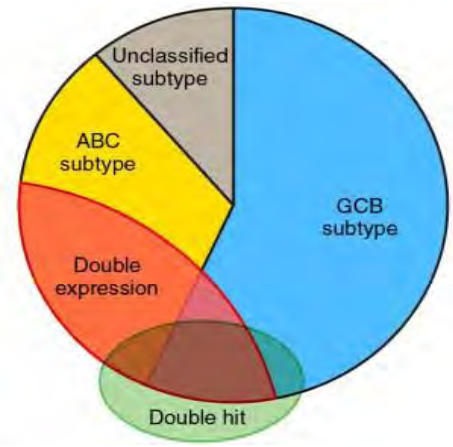


Figure 20: Diagramme de Vann schématisant les rapports entre DLBCL double-hit, double-expresseurs et la classification selon la COO (extrait de Friedberg JW)

1.4.6 Synthèse sur l'intégration conjointe des données morphologiques et cytogénétiques selon la révision 2016 de l'OMS

Au final, les DLBCL NOS deviennent donc une catégorie d'exclusion caractérisée par une morphologie non blastoïde, non Burkitt-like et dépourvue de réarrangement des gènes MYC et BCL2 et/ou BCL6 . L'ensemble de ces évolutions est résumé dans la Figure 21 tirée de la révision 2016 de l'OMS (3)

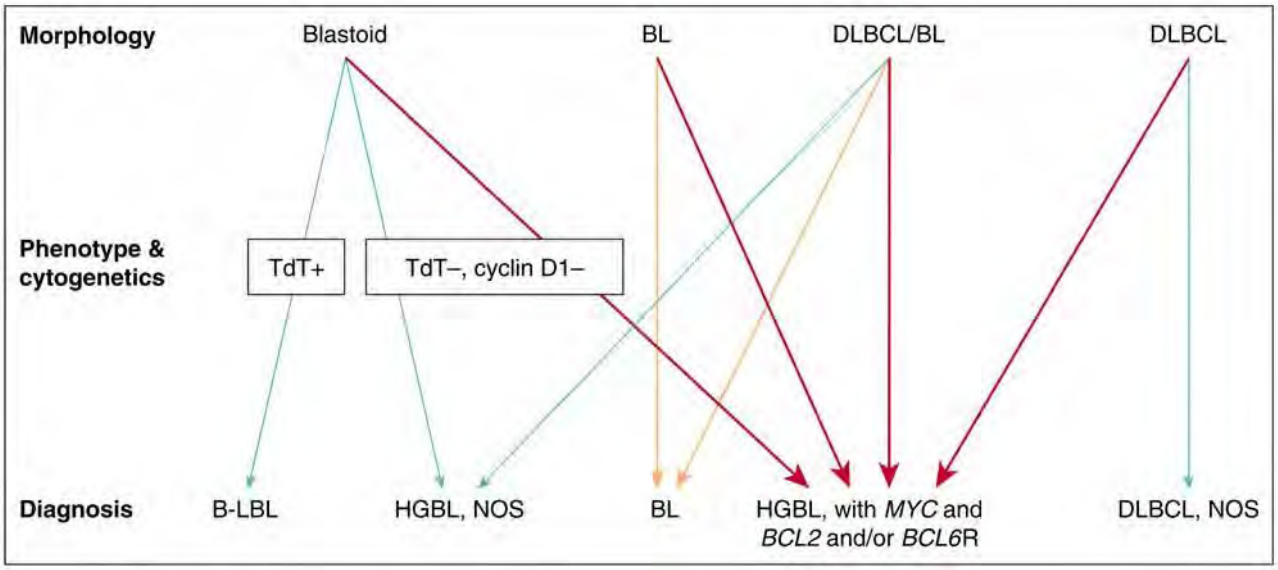


Figure 21: Résumé des modifications de la révision 2016 de la classification OMS *(extrait de Swerdlow et al)*

1.5 Étape moléculaire: nouvelles méthodes de détermination de la cellule d'origine

Du fait des discordances, néanmoins acceptables pour l'OMS, entre l'approche IHC et l'approche moléculaire par GEP, et des limites de l'utilisation du GEP en routine, le développement de techniques moléculaires alternatives accessibles en routine et robustes sur du matériel FFPE est devenu nécessaire en vue des perspectives thérapeutiques spécifiques à chacun des groupes GC, ABC ou type 3 inclassable.

Les principes et résultats des deux méthodes les plus prometteuses et en concurrence applicables sur matériel FFPE sont détaillés dans ce chapitre: il s'agit de la méthode nCounter® de Nanostring Technologies rapportée par Scott et al(33) et de la RT-MLPA rapportée par Mareschal et al(95) .

1.5.1 nCounter® Nanostring Technologies

1.5.1.1 Principe de la méthode nCounter®

La méthode commercialisée par Nanostring nécessite l'hybridation d'une sonde biotinylée de capture de l'ARN cible (*capture probe*) et une sonde de signature (*reporter probe*) portant un des 800 marquages fluorescents possibles (*bar code*) permettant son identification (Figure 22 adaptée du guide de Nanostring technologies(96)). L'évaluation de la quantité de chaque code bar

fluorescent présent dans l'échantillon permet de mesurer le niveau d'expression d'un ARN cible.

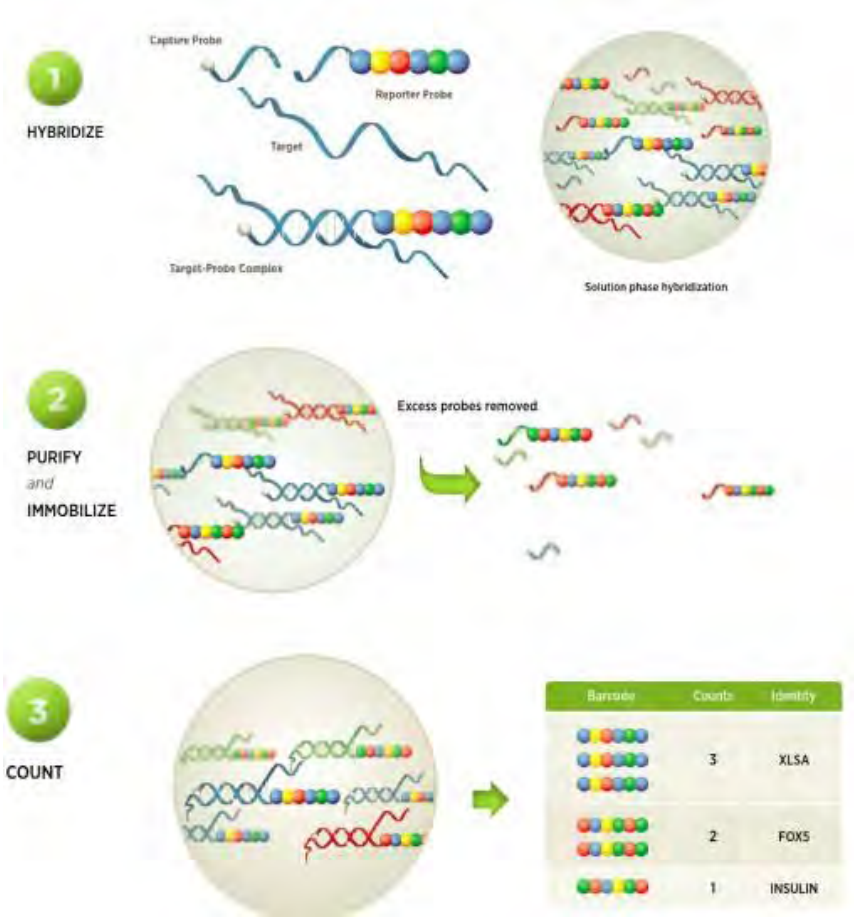


Figure 22: Principe de nCounter® Nanostring Technologies *(Adaptée du guide de Nanosting Technologies)*

Cette technologie offre des avantages notables. Tout d'abord les sondes ciblent des fragments d'ARN d'une centaine de base permettant d'éviter que la dégradation de l'ARN constitue une limite technique et explique l'applicabilité sur matériel FFPE. La technique s'étalant sur 48H nécessite un temps de manipulation réduit se résumant à 5 minutes le premier jour et 5 à 10 minutes le deuxième jour. Le coût quant à lui est conséquent, avec un équipement nécessaire spécifique, hors réactifs, de l'ordre de 200.000$ (96)

1.5.1.2 Application dans les DLBCL pour la détermination de la cellule d'origine : Lymph2Cx

La méthode nCounter® dans la détermination de la cellule d'origine des DLBCL, baptisée Lymph2Cx, cible 20 gènes discriminants et utilise un modèle statistique LPS pour l'assignation au groupe GC ou ABC comme décrit par Wright et al (29).

Lymph2Cx est validé dans deux publications de Scott et al : l'une sur le plan de la concordance avec l'assignation de la cellule d'origine par puce Affymetrix en 2014 sur 39 échantillons (97), l'autre en 2015 sur 344 patients en démontrant une valeur pronostique indépendante de l'IPI et du caractère DE (OS à 5 ans : GC 78% et ABC 56%) (33) .

1.5.2 RT MLPA

La RT-MLPA, dans la détermination de la cellule d'origine des DLBCL, a été développée par les équipes de l'université de Rouen et du centre Henri Becquerel Haute Normandie ; Cette technique a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Molecular Diagnosis* en 2015 par Mareschal et al(95).

Il s'agit d'une technique simple, peu coûteuse (de l'ordre de 5$ de réactifs par échantillon) et ne nécessitant pas d'équipement spécifique en dehors d'un accès à une plateforme de biologie moléculaire répondant aux standards actuels, c'est à dire disposant d'un thermocycleur et d'un séquenceur.

1.5.2.1 Aspects techniques

La MLPA est une méthode semi-quantitative permettant la détection simultanée du nombre de copies d'une quarantaine de gènes (98). La procédure, techniquement simple, nécessite un thermocyleur et une plateforme de séquençage standard. L'ajout d'une étape de RT (*Reverse Transcriptase)* à la MLPA, comme décrit par Eldering et al(99), a permis l'extension de cette technique à l'étude des ARN .

1.5.2.1.1 Extraction

L'étape initiale est l'extraction et la purification de l'ARN. Elle nécessite une lyse cellulaire et une élimination des lipides par des solutions détergentes. Les protéines sont éliminées par une protéase active à 56° épargnant les acides nucléiques; les contaminants issus de la technique d'extraction sont éliminés par précipitation (100).

1.5.2.1.2 Étape de Reverse transcriptase

La technique originelle de MLPA est complétée par l'action d'une enzyme type transcriptase inverse. A partir de l'ARN, des fragments d'ADN complémentaire (cDNA) sont synthétisés (99).

1.5.2.1.3 Principes du design des amorces

Le design du couple de sondes fait la force de la technique (Figure 23). Une sonde comporte un marqueur fluorescent (*carboxyfluorescein FAM*) à son extrémité, une séquence amorce sens (*Forward*), la séquence d'oligonucléotides complémentaires d'une partie de l'exon cible (*probe oligonucleotide 1*). L'autre sonde comporte une séquence de taille variable, dite de lest (*stuffer sequence*), une amorce antisens (*Reverse*) et la séquence d'oligonucléotides complémentaires d'une partie de l'exon cible (*probe oligonucleotide 2*).

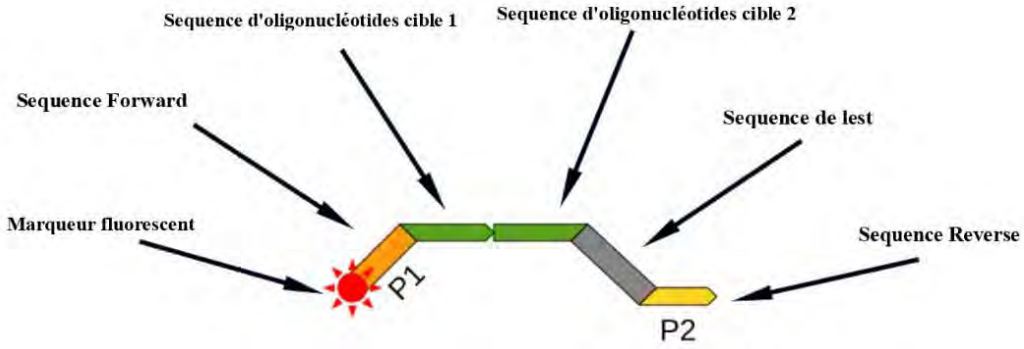


Figure 23: Principe de construction du couple de sondes de MLPA

1.5.2.1.4 Hybridation – Ligation – Amplification- Migration

Le couple de sondes s'hybride de part et d'autre de la séquence du cDNA cible (Figure 24 adaptée du site de MRC Holland par Mareschal (101,102)), à cheval sur deux exons. Les sondes sont liées par une ligase. Une étape de PCR permet l'amplification des fragments hybridés et liés. L'électrophorèse capillaire est réalisée sur un séquenceur qui permet la migration des fragments et des marqueurs de taille ainsi que la mesure de l'intensité de fluorescence. Ces données sont rapportées dans un électrophorégramme numérique.

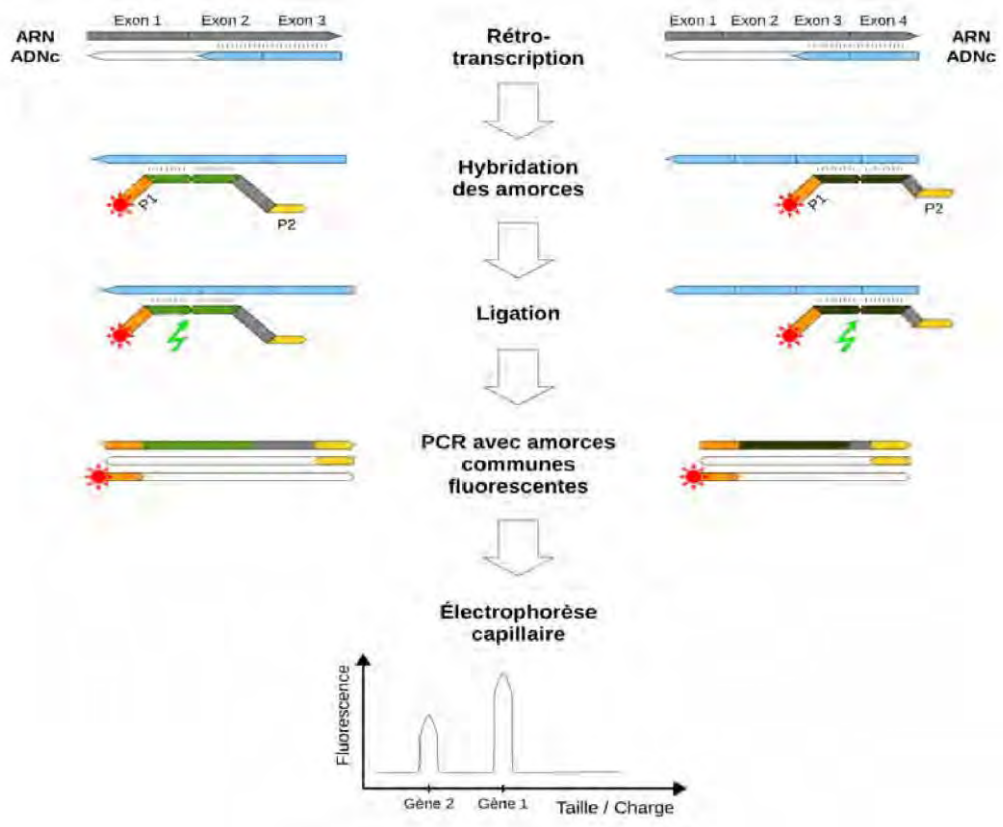


Figure 24: Principe de la RT-MLPA *(adaptée du guide MRC Holland par Mareschal et al)*

1.5.2.1.5 Analyse sur la plateforme en ligne

Une plateforme en ligne permet l'analyse des données (https://bioinfo.calym.org/RTMLPA/index,php?p=signin). Le lien fait entre durée de migration par rapport au marqueur de taille et taille du fragment permet d'identifier chaque cDNA.

Le biais pouvant résulter de la variation de la quantité de cDNA est résolu en divisant le niveau d'expression de chaque gène par la moyenne d'expression de tous les gènes mesurée dans l'échantillon ; le logarithme binaire de ces ratios définit l'expression normalisée d'un gène.

La plateforme génère un profil d'expression selon le niveau d'expression de chaque gène et calcule la probabilité de classer l'échantillon dans le groupe GC ou ABC.

Cette probabilité est définie selon un modèle de type LPS adapté de Wright et al (29) d'après les résultats de la cohorte publiée par Mareschal et al (95) .

1.5.2.1.6 Panel de 14 gènes

Le panel utilisé inclus les gènes les plus significatifs dans la discrimination des groupes ABC et GC (Tableau 2), des gènes d'intérêt pronostique, ainsi que des gènes de contrôle dont MS4A1 codant pour le CD20.

Les gènes spécifiques des groupes ABC et GC ont été sélectionnés d'après les résultats d'expression génique de 203 DLBCL publiés par Lenz et al(31) et d'après une seconde série de 225 DLBCL caractérisés sur puce Affymetrix selon la méthode de Wright et al(29) .

Gènes ABC	Gènes GC	interêt pronostique	Gènes de controle
IRF4	LMO2	TNFRSF9	MS4A1,
TNFRSF13B	NEK6	MYC	CCND1
IGHM	MYBL1	BCL2	CCND2
FOXP1	BCL6		

Tableau 2: ARN du panel RT-MLPA et intérêt

1.5.2.2 Validation de la RT-MLPA dans la classification selon la cellule d'origine

En 2015, Mareschal et al (95) publient leurs résultats sur l'utilisation de la technique de RT-MLPA avec le panel de 14 gènes dans la classification COO de 115 échantillons congelés (50 d'apprentissage et 65 de validation) déjà caractérisés sur le plan de la COO par une des méthodes de référence (technologie DASL d'Illumina validée dans la publication de Barrans et al(32)).

1.5.2.2.1 Concordance avec les techniques de Gene Expression Profiling

Sur les séries d'entraînement (50 patients) et de validation (65 patients) la concordance avec la méthode de référence DASL est respectivement de 90 et 80%. Sur une cohorte indépendante (64 patients), la concordance avec la méthode de référence Affymetrix est de 84,4%.

Dans les séries d'entraînement et dans la cohorte indépendante, toutes les discordances bénéficient au groupe type 3 inclassable (GC ou ABC sont classées dans le groupe inclassable).

Dans la série de validation, 6% des cas présentent une discordance majeure (GC classé ABC ou inversement).

1.5.2.2.2 Concordance avec l'algorithme de Hans en immunohistochimie

La concordance entre l'IHC et la RT-MLPA est de 81.8% pour le groupe GC et 84.2% pour le groupe ABC. Les 18 cas considérés zone grise (ZG) inclassable par la RT-MLPA se distribuent entre le groupe GC en IHC (4 cas) et non GC en IHC(14 cas)

1.5.2.2.3 Application au matériel FFPE

La technique s'est révélée applicable et relativement performante sur matériel FFPE. Les ARN de 30 cas ont été extraits d'un échantillon FFPE et comparés aux résultats disponibles des ces mêmes échantillons sur matériel congelé étudié avec une technique de référence (DASL d'Illumina).

Les échecs d'extraction sont au nombre de 2 (6,7%). Pour les 28 échantillons FFPE dont le type GC/ABC a été défini sur matériel congelé, 89,3% des cas ont été correctement classés (11/14 GCB, 12/12 ABC, 2/2 type 3 inclassables). Les 3 cas GC sont classés par la RT-MLPA dans le groupe ZG.

1.5.2.3 Intérêt pronostique

L'analyse de survie de 135 patients traités par R-CHOP montre que le groupe GC est associé à un pronostic plus favorable que le groupe ABC (Figure 25).

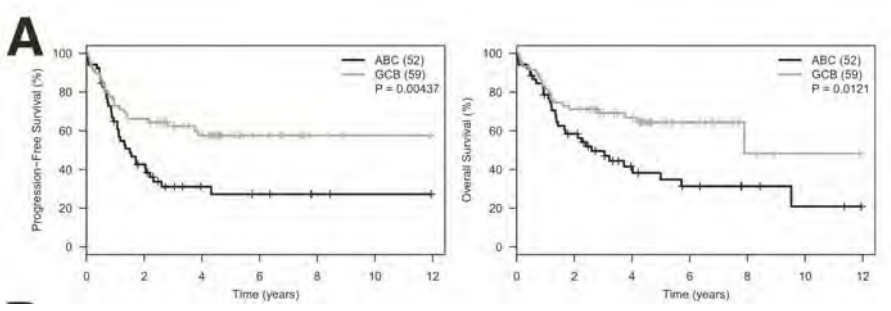


Figure 25: Valeur pronostique de la classification GC/ABC en RT-MLPA *(extrait de Mareschal et al)*

1.5.2.4 Limites de la RT-MLPA

1.5.2.4.1 Hétérogénéité tumorale et micro-environnement

L'infiltration parfois hétérogène d'un tissu par un DLBCL nécessite une sélection spatiale de la zone d'intérêt afin de concentrer l'ARN tumoral. Les études de biologie moléculaire nécessitent ainsi un indispensable contrôle morphologique du matériel étudié.

Les DLBCL constituent une prolifération tumorale plus ou moins associée à un contingent de cellules immunitaire non tumorales dans le micro-environnement pouvant modifier le profil d'expression génique .

1.5.2.4.2 Stabilité des ARN

L'ARN est sensible à la dégradation qui dépend des processus de fixation, inclusion, conditions physico-chimiques de stockage des blocs d'inclusion en paraffine (103) . La dégradation de l'ARN a ainsi longtemps constitué une limite. Le design d'amorces ciblant de petit fragments de cDNA répond à cette contrainte.

1.5.2.5 Conclusion sur la RT-MLPA

La détermination de la COO dans les DLBCL a démontré sa valeur clinique et les perspectives thérapeutiques ciblées justifient que cette information figurant dans la synthèse diagnostique soit la plus précise possible.

Le matériel FFPE présente un intérêt majeur du fait de sa simplicité d'accès et d'archivage. L'enjeux actuel, auquel la RT MLPA répond a priori, est le développement de techniques de biologique moléculaire suffisamment sensibles et robustes sur ce type de matériel .

1.6 Aspects cliniques et prise en charge thérapeutique des DLBCL

1.6.1 Présentation clinique

Les DLBCL se manifestent par une altération de l'état général, une perte de poids, un état fébrile et un syndrome tumoral le plus souvent ganglionnaire mais également extra-ganglionnaire dans 40% des cas. Le syndrome de masse est responsable de manifestations cliniques dépendant de sa localisation (10,68).

1.6.2 Stadification

La stadification est basée sur l'imagerie scannographique cervico-thoraco-abdomino-pelvienne.

La tomographie par émission de positon (TEP) couplée au scanner est désormais recommandée et codifiée dans le cadre de la stadification initiale (104,105). C'est un examen permettant d'évaluer l'atteinte nodale et extra-nodale, de suggérer une lymphopathie de bas grade sous-jacente (gradient de SUV) et ayant une valeur pronostique. De part sa haute sensibilité et spécificité dans l'évaluation de l'atteinte médullaire, elle permet en outre, en cas de positivité, de surseoir à la réalisation d'une biopsie ostéo-médullaire (BOM) (106) (104). La BOM reste indiquée selon les recommandations de l'ESMO lorsque la TEP est négative et qu'un enjeux thérapeutique est conditionné par le résultat de la BOM (10).

1.6.3 International prognostic index (IPI)

1.6.3.1 Définition

L'IPI prend en compte 5 facteurs : l'âge, les LDH (lactate déshydrogénase), le performance status selon l'Eastern Cooperative Oncology Group ECOG, le stade selon Ann Arbor et le nombre d'atteintes extra-nodales (Figure 26). Une version ajustée à l'âge (IPIaa) est validée pour les moins de 60 ans. L'IPI classe en 4 catégories de risque selon la survie: risque faible, risque intermédiaire faible, risque intermédiaire haut et risque haut.

1.6.3.2 Impact pronostique

L'IPI possède une valeur pronostique constamment vérifiée à travers les études. Il a été introduit en 1993 pour l'analyse de l'OS au cours de protocoles de polychimiothrapie par cyclophosphamide doxorubicine vincristine et prednisone (107) .

Sa valeur est conservée à l'ère du Rituximab sur le plan de la survie sans progression (PFS) et de l'OS ((108).

L'IPI constitue ainsi une synthèse de paramètres témoignant du profil biologique agressif de la tumeur mais est insuffisant pour déterminer les patients pouvant bénéficier de thérapies alternatives.

Stade Ann Arbor

Stage	
I	Involvement of a single lymphatic region (I) or localized involvement of single extralymphatic organ or site (IE)
II	Involvement of two or more lymphatic regions on the same side of the diaphragm (II) or localized involvement of a single extralymphatic organ or site and of one or more lymphatic regions on the same side of the diaphragm (IIE)
III	Involvement of lymphatic regions on both sides of the diaphragm
IV	Diffuse or disseminated involvement of one or more extralymphatic organs with or without lymphatic involvement

Performance status

0 Activité normale
1 Symptomatique, capable de réaliser de petits travaux
2 Incapable de travailler, alité moins de 50% de la journée
3 Confiné au lit ou dans un fauteuil plus de 50% de la journée
4 Confiné au lit, incapable de s'occuper de lui-même

IPI

International prognostic index (IPI)			Estimated 3-year overall survival [26–29] (95% CI)
Risk factors	Age >60 years Serum LDH > normal Stage III–IV Performance status 2–4 Extranodal sites >1		
Risk categories	Low	0–1	91 (89–94)
	Low intermediate	2	81 (73–86)
	High intermediate	3	65 (58–73)
	High	4–5	59 (49–69)
Age-adjusted international prognostic index (aaIPI) in patients ≤60 years			
Risk factors	Serum LDH > normal Stage III–IV Performance status 2–4		
Risk categories	Low	0	98 (96–100)
	Low intermediate	1	92 (87–95)
	High intermediate	2	75 (66–82)
	High	3	

LDH, lactate dehydrogenase; CI, confidence interval.

Figure 26: Stade Ann Arbor, International Prognostic Index et performance status *(adaptée de Tilly et al)*

1.6.4 Prise en charge thérapeutique

1.6.4.1.1 Bilan pré-thérapeutique

Le bilan pré-thérapeutique nécessite d'éliminer la présence d'un foyer infectieux et de s'assurer d'une fonction cardiaque et rénale ne contre-indiquant pas le recours à certaines drogues, en particulier en cas de terrain débilité.

1.6.4.1.2 Historique

L'association Cyclophosphamide (C) Doxorubicine (H) Vincristine (O) prédnisolone (P) ou CHOP est retenue comme la polychimiothérapie de référence dans les DLBCL depuis 1993 après avoir démontré une efficacité en terme d'OS à 6 ans de l'ordre de 33 % comparable aux autres polychimiothérapies mais avec une moindre toxicité (109).

Le groupe d'étude des lymphomes (GELA) a démontré, avec un recul de 10 ans, le bénéfice de l'ajout à une polychimiothérapie de type CHOP d'un anticorps anti CD20 (Rituximab) chez des patients de 60 à 80 ans de stade avancé améliorant à 5 ans la PFS (36.5% vs. 20%) et l'OS (43.5% vs. 28%) (110,111).

Depuis 15 ans, l'association R-CHOP confirme sa position de traitement de référence dans les DLBCL non sélectionnés. Le recours précoce à l'auto-greffe (10) (112)ou l'intensification thérapeutique d'après les publications de Cunningham et al (113) et Delarue et al(114) n'apporte pas de bénéfice significatif pour l'OS. De même, la nouvelle génération d'anti-CD20 (Obinutuzumab)(115) ou certaines associations avec ajustement de dose (116)) n'apportent pas de bénéfice supérieur au R-CHOP.

1.6.4.1.3 Standard actuel et réponse thérapeutique

Le traitement de référence selon les recommandations du National Comprehensive Cancer Network (NCCN), de l'European Society for Medical Oncology (ESMO) et du British Committee for Standards in Haematology (BCSH) (10,68,117) consiste en plusieurs cycles de R-CHOP dont le nombre et l'intervalle des cures, les doses et l'association à une radiothérapie sont modulés par l'age, la catégorie de risque selon l'IPI, le caractère localisé, la forte masse tumorale et les comorbidités. Les recommandations de l'ESMO de 2015 sont présentées dans la Figure 27.

Une rémission complète est observée chez 60 % des patients. L'absence d'évolution de la maladie dans les deux ans est associée à une espérance de vie identique à celle de la population générale. Quinze pourcents des patients sont d'emblée réfractaires et 30% rechutent (10).

1.6.4.1.4 Perspectives thérapeutiques

Les cibles moléculaires et les nouvelles thérapeutiques associées actuellement en cours d'exploration ont été abordé dans la partie lymphomagénèse.

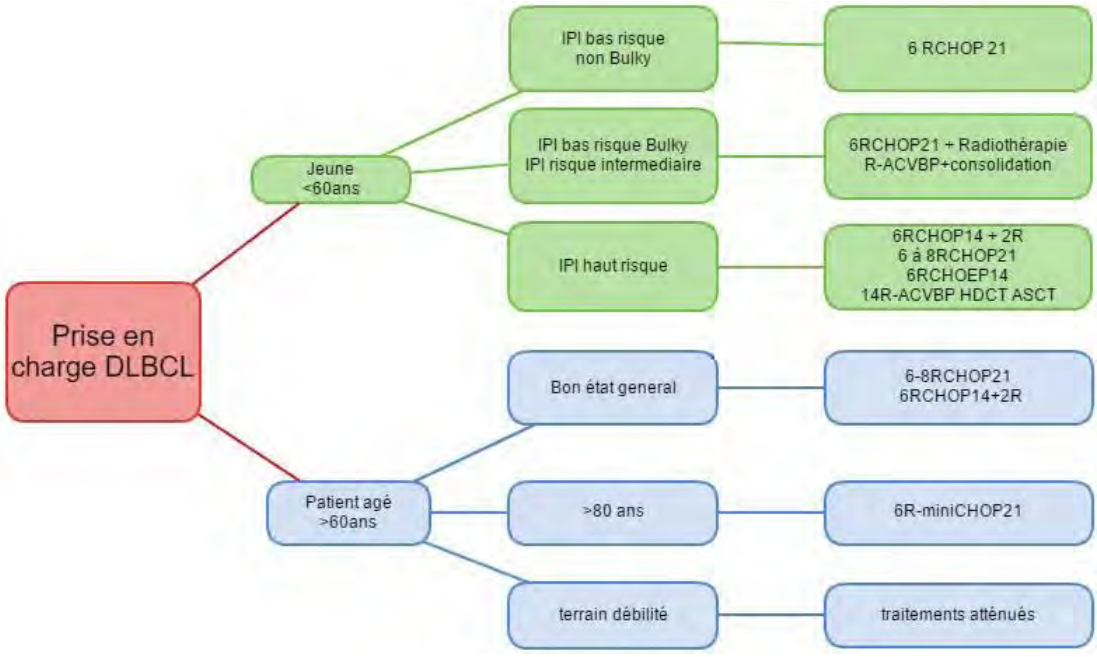


Figure 27: Prise en charge des DLBCL *(adaptée des recommandations de l'ESMO)*

Bien que la prise en charge hors protocole selon les standards actuels reste modestement impactée par les données de la biologie moléculaire, l'identification des populations pouvant tirer bénéfice d'approches thérapeutiques alternatives est un axe majeur de la recherche actuelle.

1.7 Question posée :

Dans cette introduction, le concept et l'intérêt du démembrement moléculaire des DLBCL selon la COO, les anomalies moléculaires associées à chacun des groupes ainsi que les principales techniques pour les mettre en évidence ont été présentés.

Au vu des enjeux thérapeutiques futurs autour de cette classification COO avec l'émergence de thérapies innovantes spécifiques à chacun des sous groupes de DLCBL, celle-ci doit aujourd'hui être approchée le plus précisément possible.

L'approche IHC selon Hans est la plus communément utilisée en routine depuis plus d'une décennie. Elle présente un taux de discordance avec le GEP de l'ordre de 20 %.

Nous cherchons à comprendre quels DLBCL sont correctement classés en IHC selon Hans afin d'optimiser la combinaison des approches diagnostiques.

Nous nous sommes interessés à l'appartenance au groupe GC définie par la simple positivité du marqueur centro-germinatif CD10. Cependant, les DLBCL présentant une expression concomitante du CD10 et du marqueur de type post centro-germinatif MUM1 ont été relativement peu étudiés dans la littérature. L'étude princeps de Hans et al recense 7,2% de CD10+MUM1+ parmi les DLBCL sans faire état de leur classification moléculaire précise par GEP.

Afin de compléter l'offre technique et diagnostique du centre d'expertise nantais du réseau Lymphopath, le service d'Hématologie biologique du CHU de Nantes déploie la RT-MLPA en vue d'une application diagnostique en routine.

Ce travail vise donc à :

- vérifier la classification COO en RT-MLPA des DLBCL NOS *de novo* de type GC selon l'algorithme de Hans mais présentant un phénotype distinct CD10+ MUM1- ou CD10+ MUM1+

- comparer les profils immunophénotypiques, cytogénétiques et cliniques de ces deux sous groupes de DLBCL.

2 PATIENTS ET MÉTHODE

2.1 Schéma et objectifs de l'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective régionale multicentrique.

L'objectif principal de cette étude est de vérifier la classification COO en RT-MLPA des DLBCL *de novo* de type GC selon l'algorithme de Hans mais présentant un phénotype distinct soit CD10+ MUM1- soit CD10+ MUM1+.

L'objectif secondaire est de comparer les profils immunophénotypiques, cytogénétiques et cliniques de ces 2 sous groupes de DLBCL.

2.2 Patients

2.2.1 Sélection des patients

La sélection des patients a été réalisée à partir d'une base de données (LENABase du service d'hématologie du CHU de Nantes colligeant tous les dossiers de lymphome discutés en RCP régionale) incluant 449 patients avec un diagnostic de DLBCL sur la période de 2006 à mars 2016.

Ces cas incluent des patients âgés de plus de 18 ans ayant consulté au CHU de Nantes, aux nouvelles cliniques nantaises, au centre hospitalier de la Roche sur Yon et au centre hospitalier de Saint-Nazaire.

Le diagnostic de DLBCL a été posé selon les critères de l'OMS 2008 ou 2016 pour les cas les plus récents. Tous ces cas ont bénéficié d'une relecture par un hémato-pathologiste expert du CHU de Nantes

2.2.1.1 Critères d'exclusion

Dans un premier temps, afin de constituer une cohorte homogène de DLBCL NOS *de novo*, nous avons exclu les dossiers suivants :

- DLBCL secondaires à la transformation d'un lymphome de bas grade (lymphome folliculaire, lymphome lymphocytique, maladie de waldenstrom, lymphome de la zone marginale)

- Récidives de DLBCL

- Antécédent d'autre lymphome connu (Lymphome de Hodgkin, lymphome T)

- Lymphome survenant dans un contexte d'immunodépression de type greffe d'organe ou séropositivité VIH

- les lymphomes inclassables de morphologie intermédiaire entre un DLBCL et un lymphome de Burkitt selon la classification OMS 2008

- les lymphomes inclassables de morphologie intermédiaire entre un DLBCL et un et un lymphome de Hodgkin selon la classification OMS 2008

- les HGBL NOS et HGBL avec réarrangements MYC BCL2 et/ou BCL6 selon la classification 2016 sur base du compte rendu anatomo-pathologique.

Dans un second temps, pour des raisons techniques, les cas suivants sont exclus:

- échec de l'IHC complémentaire si nécessaire du fait de l'absence de témoin interne

- matériel tumoral non fixé dans du formol (exemple : Liquide de Bouin, AFA) altérant la qualité de l'ARN

- matériel tissulaire épuisé ne permettant pas de compléter les analyses phénotypiques et moléculaires

2.2.2 Recueil de données cliniques

L'âge au diagnostic, le *Performance Status*, le stade d'Ann Arbor, le nombre et le type de localisations extra-nodales, le taux de LDH, sont recueillis de manière rétrospective dans les dossiers médicaux et utilisés pour le calcul de l'IPI.

La PFS est définie par l'intervalle entre la date du diagnostic et la date de première progression, de récidive, changement de traitement du fait d'une maladie non contrôlée ou de décès sans progression documentée. L'OS est définie par l'intervalle de temps entre la date du diagnostic et la date de décès.

2.3 Examen anatomo-pathologique

Les cas finalement retenus sont des DLBCL NOS selon les données du compte rendu anatomopathologique définitif enregistré dans le réseau Lymphopath. Ces cas ont été revus (lames HES et phénotype minimum requis) après désarchivage des lames et blocs afin de confirmer l'ensemble des critères d'inclusion.

Le phénotype minimum requis pour chacun des cas devait comporter les anticorps suivants : CD20, CD3, CD5, CD10, BCL6, BCL2, MUM1, MYC (Tableau 3) . L'étude IHC, complétée si nécessaire en fonction des cas, a été réalisée à partir du matériel FFPE sur automate DAKO.

Pour CD10, BCL6 et MUM1, le seuil de positivité est de 30% comme défini par Hans et al (30). Pour MYC nous avons retenu le seuil de positivité > 40% et pour BCL2, le seuil de positivité > 50%, comme définis dans la classification OMS 2016.

anticorps	laboratoire	clone	référence	dilution	Seuil positivité
CD10	LEICA	CD10	NCL-L-CD10-270	1/40	30 %
BCL6	DAKO	PG6B6p	M7211	1/20	30 %
MUM1	DAKO	MUM1p	M7259	1/100	30 %
BCL2	DAKO	124	M0887	1/50	50 %
C MYC	EPITOMICS	EP121	AC-0116	1/500	40 %
CD05	LEICA	4C7		1/50	Non défini

Tableau 3: Références et seuils de positivité pour les anticorps utilisés

L'étape cytogénétique systématique avec recherche des réarrangements MYC BCL2 BCL6 est en cours afin d'identifier d'éventuels HGBL avec réarrangement notamment parmi les cas les plus anciens.

2.4 RT-MLPA

2.4.1 Technique

2.4.1.1 Extraction ARN

Deux coupes de 10µ sont réalisées sur les blocs de matériel tumoral FFPE et placées dans un tube Eppendorf 200µL. Si le prélèvement associe des secteurs tumoraux et non tumoraux, les coupes à 10µ sont étalées sur une lame blanche et la zone tumorale est cerclée, permettant une macrodissection.

Dans les 24 heures suivant la coupe, l'ARN est extrait selon le protocole du kit Maxwell RSC RNA FFPE Promega Corp avec les réactifs fournis dans le kit (118).

300µL d'huile minérale est incubé avec les deux coupes FFPE de 10µm à 80° pendant 2 minutes puis ajouté à un mix de tampon de lyse, de proteinase K et de Blue Dye. Les échantillons sont incubés à 56° pendant 15min puis 80° pendant une heure. Un cocktail de 50µL associant la Dnase, le tampon de Dnase et du MgCl2 0.09M est ajouté à la phase liquide de chaque échantillon, puis incubé à température ambiante 15min et centrifugé pendant 2minutes. La phase aqueuse est transférée dans le puits n°1 de la cartouche du kit Maxwell RSC RNA FFPE avec 275µL d'eau. Le processus d'extraction est ensuite réalisé sur l'automate Maxwell.

La quantification de l'ARN n'est pas réalisée, ce critère n'étant pas un facteur limitant ni un critère de qualité technique.

2.4.1.2 Étape de Reverse Transcriptase

Un premier mélange de 2,5µL dNTP à 10mM, 2µL d'héxamères à 200µM et 8,5µL d'ARN est incubé à 65° pendant 10min puis ajouté à 2µL de DTT(dithithreitol) à 100mM, 4µL de Tampon First Strand 5x, 0,5µL de Rnase à 40U/ et 0,5µL de MMLV-RT (Moloney murine leukemia viruse reverse transcription buffer) à 200U/µL incubé à 37° pendant 45min puis 70° pendant 15 min. 30µL d'eau distillée est ajouté dans chaque tube (Annexe 3).

2.4.1.3 MLPA

2.4.1.3.1 Hybridation-Ligation-Amplification

La phase d'hybridation nécessite l'incubation à 95° pendant 2 minutes puis à 60° pendant 60minutes de 1,5µL de tampon SALSA MLPA (MRC Holland) et 1µL du Mix d'oligonucléotides du panel 14 gènes fourni par l'université de Rouen dont le principe du design est décrit dans l'article de Mareschal et al(95).

A la phase de ligation, 25µL d'eau, 3µL du tampon du ligation A et B et 1µL de ligase 65 est incubé avec le produit d'hybridation à 54° pendant 15 minutes et 98° pendant 5 minutes.

L'amplification se déroule après l'ajout au produit de ligation de 1,5µL d'eau, 5µL d'enzyme Q5, 0,5µL de primer Forward et 0,5µL de primer Reverse marqué au FAM. Le programme d'amplification sur le thermocycleur est: 6 minutes à 94°; 35 cycles (30 secondes à 94°, 30 seconds à 58°, 30 secondes à 72°); 4 minutes à 72°; puis 16°)

2.4.1.3.2 Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire des échantillons est réalisée sur un séquenceur 3130XL-Applied Biosystems qui permet la migration, la mesure de l'intensité de fluorescence et rapporte ces données dans un electrophorégramme numérique au format fsa.

2.4.2 Analyse

2.4.2.1.1 Critères de qualité de la technique

Le profil d'expression des ARN est considéré comme harmonieux si les pics d'expressions des gènes cibles sont alignés avec les tailles attendues et en l'absence de bruit de fond significatif. L'expression de MS4A1, témoignant de la présence d'une population lymphoïde B CD20+, est considérée comme un critère nécessaire pour l'interprétabilité.

2.4.2.1.2 Traitement des données

Le fichier *fsa* est chargé sur la plateforme en ligne (https://bioinfo.calym.org/RTMLPA/index,php?p=signin) développée par l'équipe de l'université de Rouen et permet de générer un profil d'expression pour chacun des 14 gènes (IRF4, TNFRSF13B, IGHM, FOXP1, LMO2, NEK6, MYBL1, BCL6, MS4A1, CCND1, CCND2, TNFRSF9, MYC et BCL2) à partir des valeurs d'expression normalisée.

L'expression normalisée permet la comparaison des échantillons avec les résultats de la cohorte de référence indépendamment de la quantité d'ARN.

Une probabilité de classer un échantillon dans le groupe GC ou ABC est calculée (Figure 28 Figure 29 Figure 30 Figure 31).

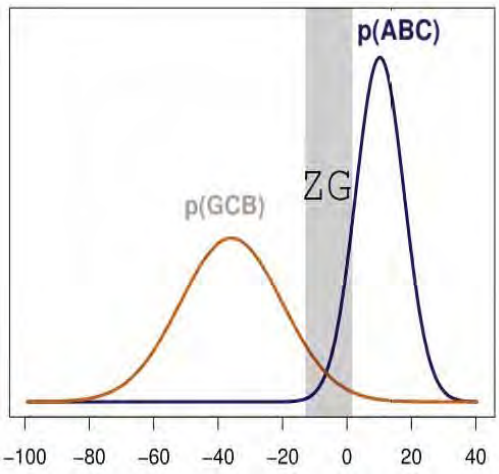


Figure 28: Probabilité de classification dans les groupes GC (courbe rouge), ABC (courbe bleue) et ZG (zone grise) selon le score RT-MLPA.

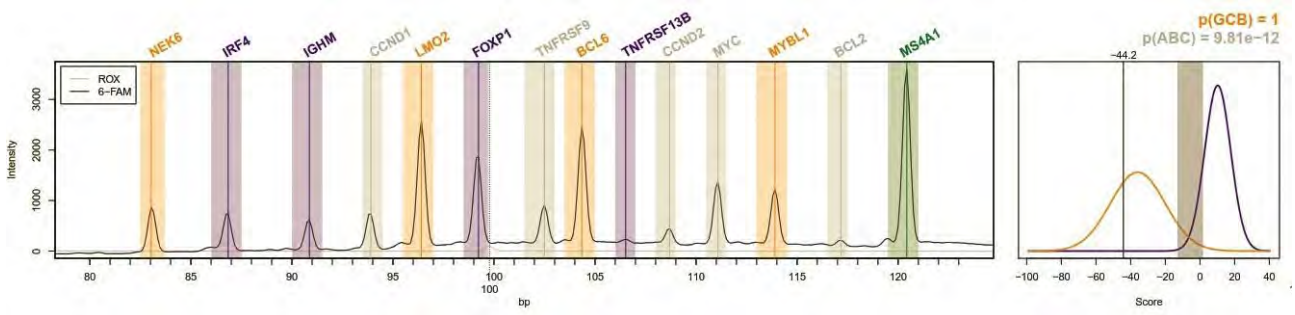


Figure 29: Profil d'expression selon le panel 14 ARN d'un DLBCL de type GC

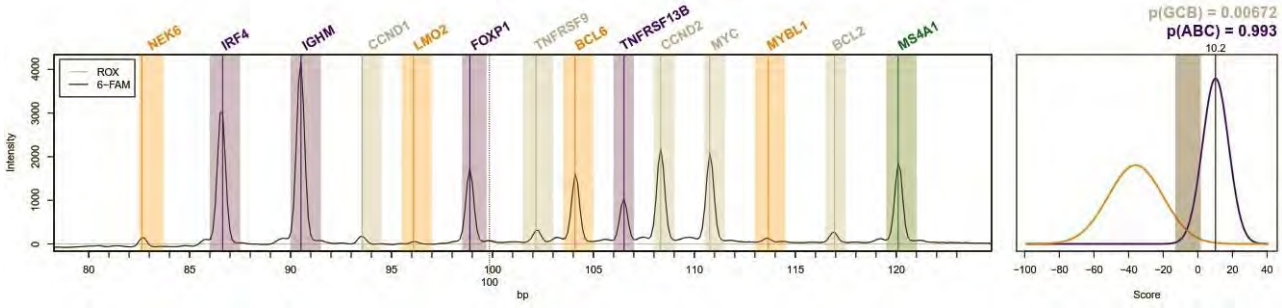


Figure 30: Profil d'expression selon le panel 14 ARN d'un DLBCL de type ABC

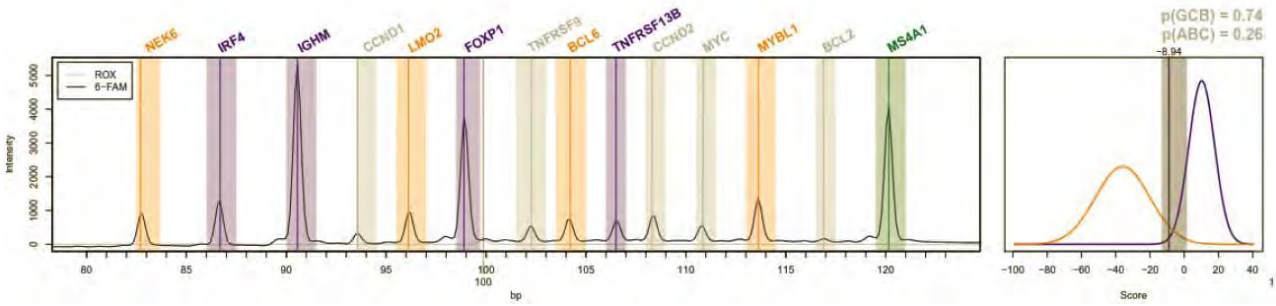


Figure 31: Profil d'expression selon le panel 14 ARN d'un DLBCL de type ZG

2.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel MedCalc version 15.10. Le test exact de Fisher et le test du Chi² sont utilisés selon les effectifs pour déterminer l'association entre les différentes variables catégorielles qualitatives et les deux sous-groupes étudiés. Le test de Mann Witney est utilisé pour determiner la relation entre les données quantitatives (niveaux d'expression en RT-MLPA) et les deux sous groupes. Les analyses de survie en univarié reposent sur la méthode de Kaplan-Meier et les courbes sont comparées avec un test log-rank.

Pour tous les tests, une valeur de $p<0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

3 RÉSULTATS

3.1 Flow chart des patients inclus et matériel sélectionné

La relecture du compte-rendu anatomo-pathologique et l'examen du dossier médical permet d'exclure 121 patients sur les 449 identifiés sur la cohorte.

Pour les 328 DLBCL NOS *de novo* restants après exclusion selon les critères précédemment cités, l'examen des blocs d'inclusion en paraffine permet d'exclure les cas pour lesquels le matériel est épuisé ou fixé dans le liquide de Bouin ou l'AFA. Par ailleurs, les cas ne disposant pas de témoin interne validant les IHC complémentaires réalisées pour l'étude sont exclus de l'analyse. Au total 255 cas de DLBCL NOS *de novo* sont retenus (Figure 32)

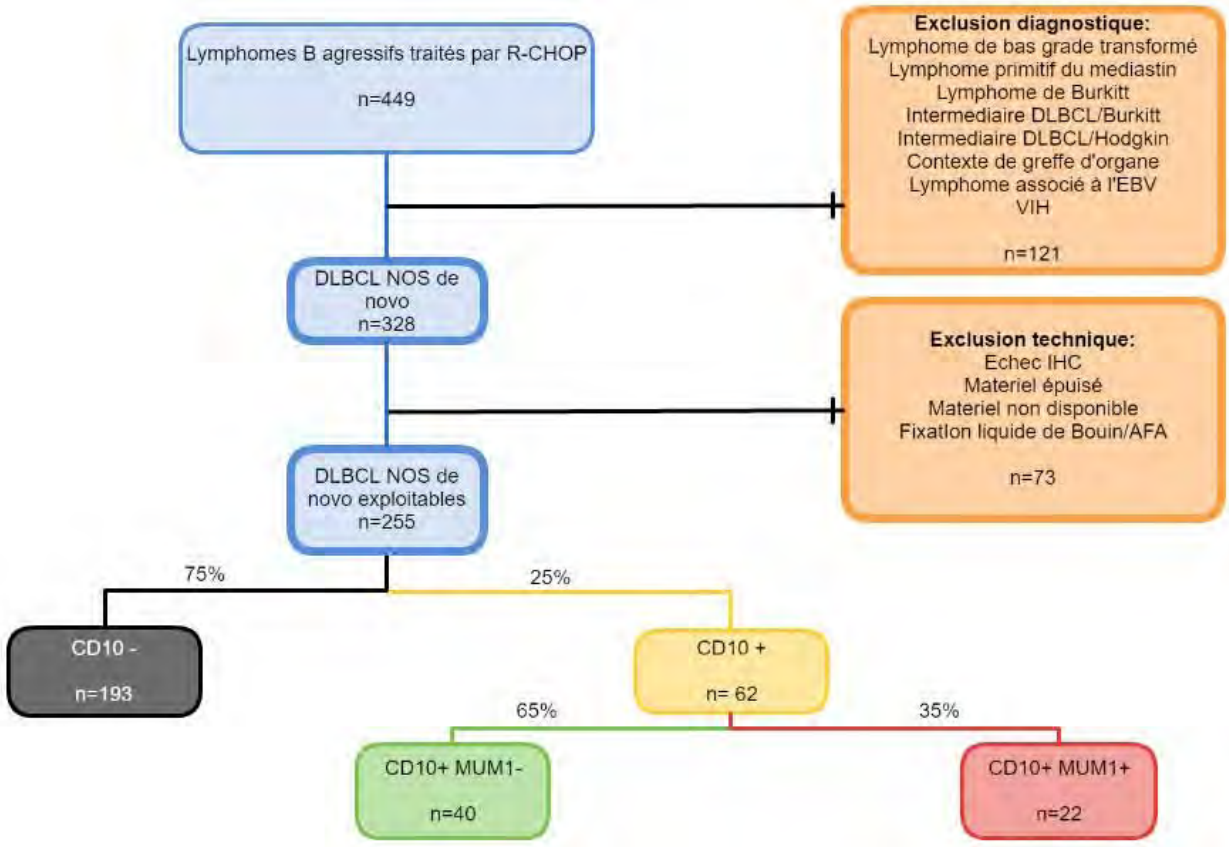


Figure 32: Flow Chart

3.2 Caractéristiques anatomo-pathologiques des groupes IHC CD10+MUM1- CD10+MUM1+

Au total, parmi les 255 DLBCL NOS *de novo* retenus pour l'analyse phénotypique et moléculaire complète, 75% (n=193/255) sont CD10- et 25% (n=62/255) sont CD10+.

Morphologiquement ces DLBCL CD10+ sont relativement homogènes avec une cytologie majoritairement de type centroblastique.

Dans le groupe CD10+, défini de type GC selon l'algorithme de Hans, l'expression de MUM1 est observée chez 35% patients (22/62) ; la majorité des cas étant MUM1- (65% n=40/62). Globalement, ce phénotype GC aberrant CD10+ MUM1+ caractérise 8 % (22/255) des DLBCL *de novo* (Tableau 4 Figure 33)

D'un point de vue phénotypique, les deux groupes de patients CD10+ MUM1- et CD10+ MUM1+ ne présentent pas de différence significative en terme d'expression des marqueurs d'intérêt. En effet, les expressions isolées ou concomitantes de MYC et BCL2 sont comparables dans les deux groupes, avec 28 % et 27 % de phénotypes DE retrouvés respectivement dans les groupes CD10+ MUM1- et CD10+MUM1+ (Figure 34). De même, nous n'avons pas retrouvé de différence significative en terme d'expression du CD5. Il semble exister une différence significative d'expression de BCL6, retrouvée dans 100 % des cas CD10+ MUM1+, contre 83% des cas CD10+ MUM1- (p=0,044).

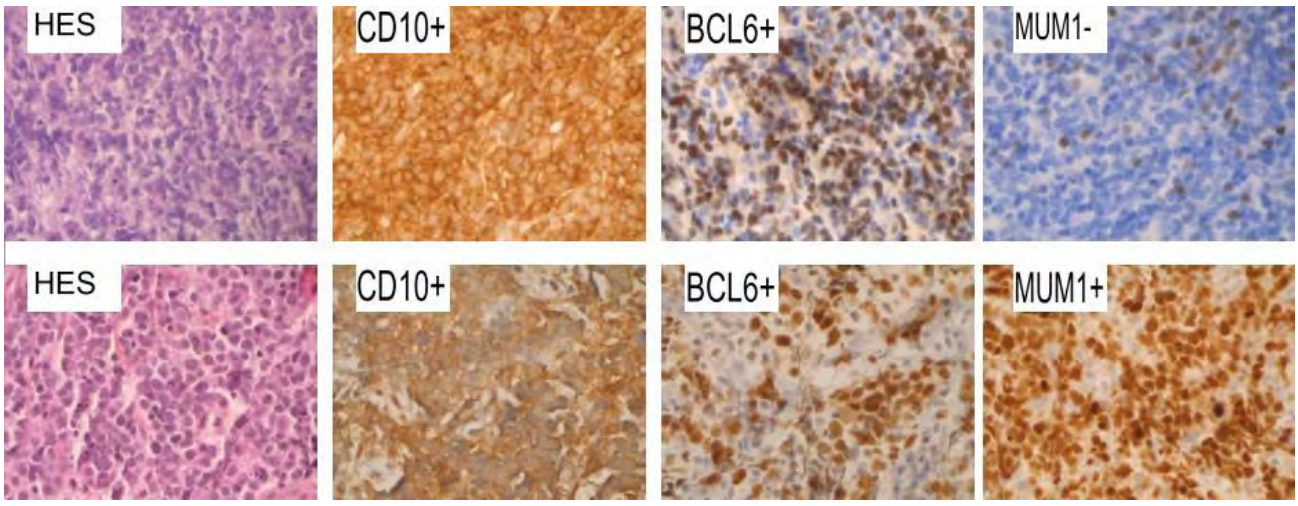


Figure 33: Morphologie et immunophénotype de DLBCL NOS CD10+MUM1- et CD10+MUM1+ (40x)

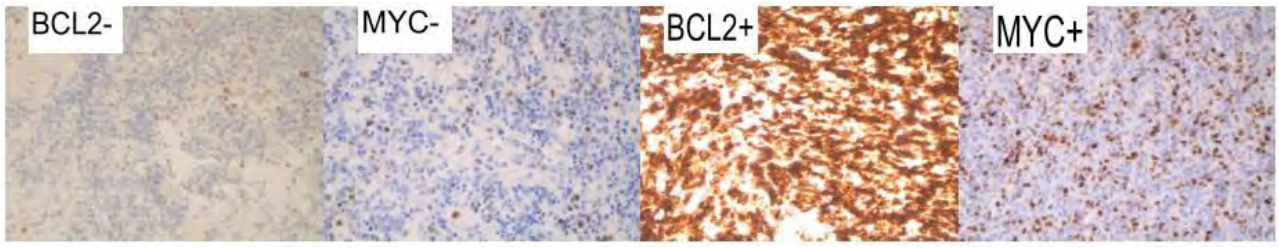


Figure 34: IHC MYC et BCL2

	TOTAL	(%)	CD10+ MUM1-		CD10+ MUM1+		p
			40	65%	22	35%	
BCL6+	55	89 %	33	83 %	22	100 %	0,044
C-MYC +	19	31 %	14	35 %	5	23 %	0,39
BCL2 +	49	79 %	31	78 %	18	82 %	0,75
Double expresseurs	17	27 %	11	28 %	6	27 %	1
CD5+	2	3 %	1	3 %	1	5 %	1

Tableau 4: Caractéristiques IHC des groupes CD10+ MUM1- et CD10+ MUM1+

3.3 Caractéristiques cliniques des groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+

Les caractéristiques cliniques des 62 patients finalement retenus avec le diagnostic de DLBCL NOS *de novo* de phénotype GC sur la base de l'expression du CD10 sont résumées dans le Tableau 5.

L'age médian est de 67ans (de 23 à 64 ans) avec 77% (n=48) de patients de plus de 60 ans. Il n' y a pas de prédominance de sexe.

Les stade III/IV concernent 73% (n=45) des patients. 37% (n=23) des patients ont un IPI élevé (score 3-5) sans différence significative entre les deux groupes.

La présence des symptômes B est retrouvée plus fréquemment de façon significative dans le groupe CD10+ MUM1+ (48% Vs 23% p=0,03).

	TOTAL	(%)	CD10+ MUM1-		CD10+ MUM1+		p
	62		40	65 %	22	35 %	
Sex							
Masculin	33	53 %	21	53 %	12	55 %	0,87
Feminin	29	47 %	19	48 %	10	45 %	
Age							
> ou égal à 60 ans	48	77 %	33	83 %	15	68 %	0,19
< 60 ans	14	23 %	7	18 %	7	32 %	
LDH							
Normales	33	53 %	19	48 %	14	64 %	0,223
Augmentées	29	47 %	21	53 %	8	36 %	
Nombre d'atteintes extra-nodales							
<2	56	90 %	37	93 %	19	86 %	0,66
2 ou plus	6	10 %	3	8 %	3	14 %	
Stade Ann Arbor							
Inférieur ou égal à II	17	27 %	9	23 %	8	36 %	0,24
> ou égal à III	45	73 %	31	78 %	14	64 %	
performance status ECOG							
inférieur ou égal à 1	54	87 %	35	88 %	19	86 %	1
supérieur ou égal à 2	8	13 %	5	13 %	3	14 %	
IPI							
Groupe de Risque bas (score 0-2)	39	63 %	23	58 %	16	73 %	0,23
Groupe de Risque elevé (score 3-5	23	37 %	17	43 %	6	27 %	
Symptomes B							
Présents	20	32 %	9	23 %	11	50 %	0,03
Absents	42	68 %	31	78 %	11	50 %	

Tableau 5: Caractéristiques cliniques des groupes CD10+ MUM1- et CD10+ MUM1+

3.4 Objectif principal : classification COO en RT-MLPA des groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+

3.4.1 Validation de l'étape pré-analytique

Il est recommandé par l'équipe de l'Université de Rouen que l'ARN soit extrait dans les 24 heures suivant la coupe.

Nous avons réalisé des tests afin d'évaluer la robustesse de la technique soumise à différentes contraintes pratiques voire extrêmes. Les résultats d'une coupe standard à 10µ extraite dans les 24H sont comparés avec ceux de coupes standard conservées 3 mois à -80°, de coupes à 10µ sur-paraffinées conservées 3 mois à 4° et de coupes standard conservées 3 mois à température ambiante.

	Coupe < 24H	3 MOIS Congélation -80°	3 MOIS Surparaffinage 4 °	3 MOIS température ambiante
Echantillon 1	VALIDE			VALIDE
Echantillon 2	VALIDE			ECHEC
Echantillon 3	VALIDE	VALIDE	VALIDE	VALIDE
Echantillon 4	VALIDE	VALIDE	VALIDE	VALIDE
Echantillon 5	VALIDE	ECHEC	VALIDE	VALIDE

Tableau 6: Tests de robustesse de la RT-MLPA soumise à différentes contraintes

Toutes les conditions donnent des résultats valides en RT-MLPA mais les coupes à 24H et le sur-paraffinage à 4°sont les plus fiables (Tableau 6).

3.4.2 Résultats des analyses dans les conditions pré-analytiques recommandées

Dans la cohorte, 89% (n=54) des cas sont exploitables avec des profils interprétables (82% dans le groupe GC MUM1- et 95% dans le groupe GC MUM1+). On compte 11% (n=8) de cas non interprétables. Sept cas ont un profil d'expression très altéré (non alignement des pics) en lien avec la dégradation de l'ARN ; un cas (dans le groupe CD10+MUM1-) n'exprime pas MS4A1 , gène codant pour le CD20, considéré comme critère de qualité.

Finalement, parmi les cas interprétables, 67 % (n=36) sont classés GC , 19 % (n=10) ABC et 15 % (n=8) en zone grise (ZG=cas non classables du fait d'une probabilité intermédiaire entre GC et ABC) en RT-MLPA. (Tableau 7).

				IHC GC selon Hans n=62				
		TOTAL	(%)	CD10+ MUM1-		CD10+ MUM1+		p
RT MLPA	RT MLPA GC	36	*67 %*	29	*88 %*	7	*33 %*	0,0005
INTERPRETABLE	RT MLPA ABC	10	*19 %*	0	*0 %*	10	*48 %*	
N=54/62 (89%)	RT MLPA Zone Grise	8	*15 %*	4	*12 %*	4	*19 %*	
RT MLPA non interprétable N=8/62 (11%)				7		1		

Tableau 7: Classification COO en RT MLPA des groupes CD10+ MUM1- et CD10+ MUM1+

Les patients CD10+MUM1- se divisent en deux groupes : soit GC pour la majorité d'entre eux (88 % n= 29) soit ZG (12% n=4).

Les patients CD10+MUM1+ se divisent en trois groupes distincts : soit GC (33 % n=7) soit ABC (48% n= 10) soit ZG (19% n=4)

D'un point de vue statistique, cette différence de classement en RT MLPA des deux groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+ est significative (p=0,0005).

La Figure 35 synthétise les résultats en faisant apparaître pour chaque patient CD10+MUM1- (ligne horizontale en vert) CD10+MUM1+ (ligne horizontale en rouge), la valeur numérique du score en RT-MLPA et la classification en faveur du groupe GC (ligne étendue dans la partie gauche), ABC (ligne étendue dans la partie droite) ou ZG (partie centrale).

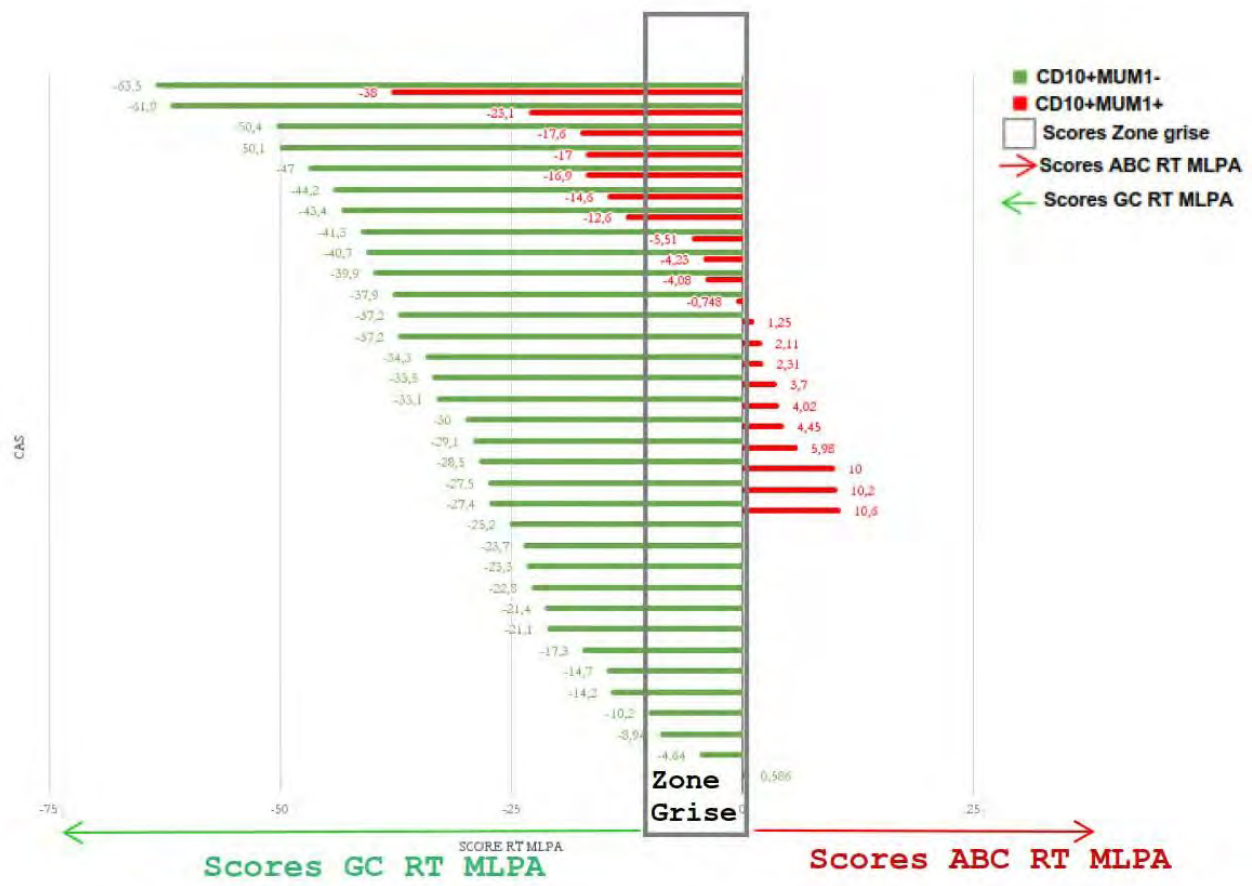


Figure 35: Scores en RT-MLPA et classification GC (partie gauche), ZG (partie centrale) ABC (partie droite) de chaque patient CD10+MUM1- (ligne en vert) CD10+MUM1+ (ligne en rouge)

Au total, les mouvements de reclassement entre les groupes IHC et RT-MLPA sont schématisés dans la Figure 36.

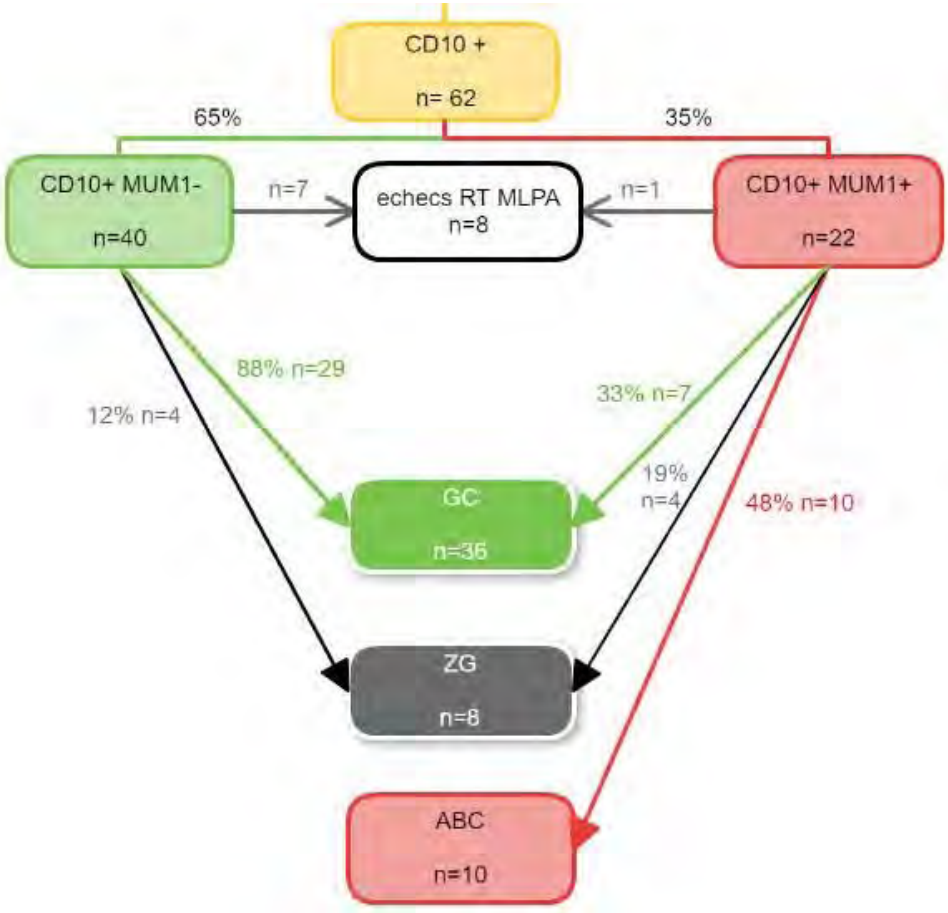


Figure 36: Reclassement des cas CD10+MUM1- et CD10+MUM1+ dans les groupes GC ABC ZG selon les données moléculaires de la RT-MLPA

Si l'on compare les profils phénotypiques des cas reclassés GC ou ABC en RT-MLPA, la proportion de cas MYC+ et DE en IHC semble plus importante dans le groupe ABC mais cette différence n'est pas statistiquement significative (respectivement p=0,71 et p=0,46) (Tableau 8)

	TOTAL	(%)	GC RT MLPA		ABC RT MLPA		ZG RT MLPA	
			36 CD10+MUM1- N=29 CD10+MUM1+ N=7	81% 19%	10 CD10+MUM1+ N=10	100%	8 CD10+MUM1- N=4 CD10+MUM1+ N=4	50% 50%
BCL6+	44	96 %	34	94 %	10	100 %	5	63%
C-MYC +	19	41 %	14	39 %	5	50 %	0	0%
BCL2 +	36	78 %	27	75 %	9	90 %	8	100%
Double expresseurs (DE)	17	37 %	12	33 %	5	50 %	0	0%

Tableau 8: Profils IHC pour BCL6 MYC BCL2 des groupes RT-MLPA GC ABC et ZG

3.5 Profils moléculaires des groupes CD10+MUM1-/CD10+MUM1+ et des groupes GC/ABC/ZG définis en RT MLPA

3.5.1 Comparaison des groupes IHC CD10+MUM1- CD10+MUM1+

3.5.1.1 Niveaux d'expression en ARN des 14 gènes du panel

Pour chacun des patients des groupes IHC CD10+MUM1- et CD10+MUM1+, le niveau d'expression des 14 ARN du panel est représenté dans la Figure 37.

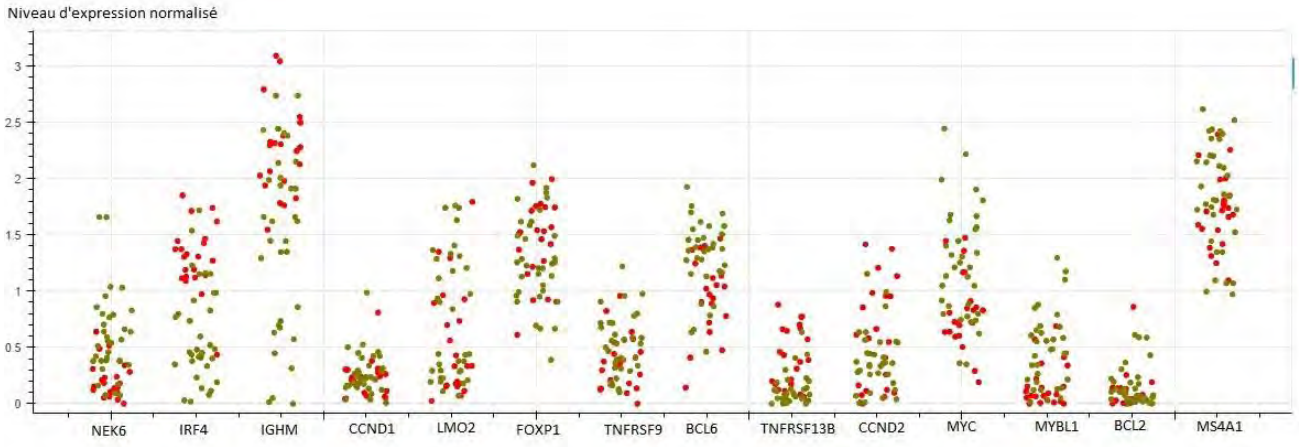


Figure 37: Niveaux d'expression normalisée en RT-MLPA des 14 ARN cibles pour chaque patient du groupe CD10+MUM1- (en vert) CD10+MUM1+ (en rouge)

3.5.1.2 Gènes d'intérêt pour la classification COO

Si l'on s'intéresse aux gènes spécifiques des groupes ABC ou GC (Tableau 9) les niveaux d'expression des gènes IRF4, IGHM, LMO2, NEK6, MYBL1 semblent différents entre les groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+.

Gènes ABC	Gènes GC	interêt pronostique	Gènes de controle
IRF4	LMO2	TNFRSF9	MS4A1,
TNFRSF13B	NEK6	MYC	CCND1
IGHM	MYBL1	BCL2	CCND2
FOXP1	BCL6		

Tableau 9: Gènes du panel en RT MLPA

Plus précisément le gène IRF4 (codant pour la protéine MUM1) détecté en RT-MLPA présente des niveaux d'expression significativement différents entre les deux groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+ avec des moyennes respectives de 0.631 Vs 1.291 ($p<0,001$) (Figure 38). Ce résultat s'accorde avec la différence d'expression de MUM1 en IHC entre ces

groupes . A noter que le niveau d'expression d'IRF4 dans le groupe CD10+MUM1- n'est pas nul puisque le seuil de négativité de MUM1 en IHC défini selon Hans est compris entre 0 et 30 %. Sur la base du niveau d'expression des ARN IFR4, la distinction IHC entre les groupes MUM1+ et MUM1- selon Hans est observée au niveau transcriptomique.

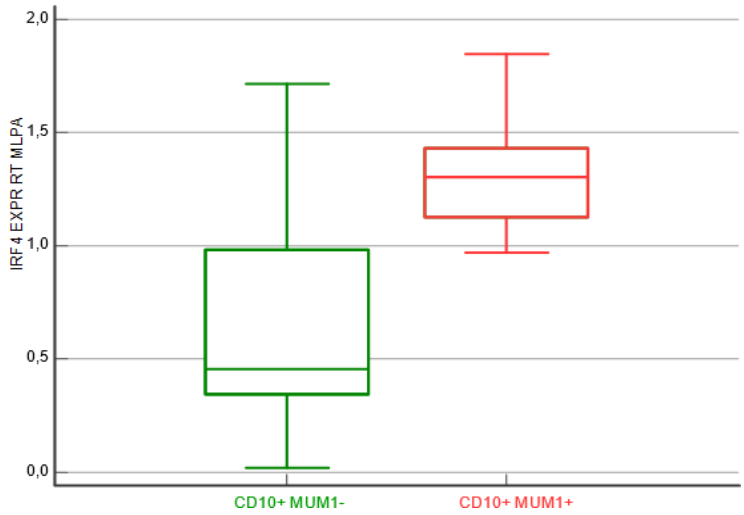


Figure 38: Expression de IRF4 dans les groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+

3.5.1.3 Gènes d'intérêt pronostique MYC et BCL2

Le niveau d'expression des ARN BCL2 n'est pas significativement différent entre les groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+ (0.113 Vs 0.154 p=0,43) comme observé au niveau protéique en IHC.

En revanche, le niveau d'expression des ARN MYC est significativement plus élevé dans le groupe CD10+MUM1- (1.221 Vs 0.828 p<0,001) (Figure 39). Cette tendance avait été notée en IHC sans être néanmoins significative (35 % Vs 23 % p=0,29).

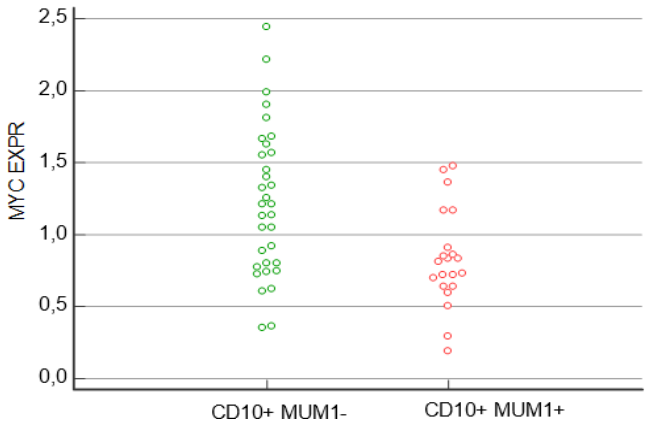


Figure 39: Différence du niveau d'expression des ARN MYC dans les groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+

Nous avons donc voulu vérifier la concordance entre les profils d'expression de MYC à l'échelon protéique en IHC (selon des paliers d'expression de 10%) et ARN en RT-MLPA. La corrélation entre ces profils est finalement faible (r=0,261 p=0,06) (Figure 40).

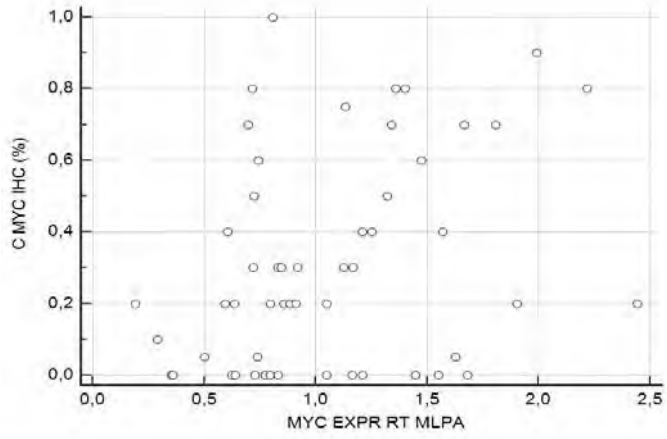


Figure 40: Corrélation entre les niveaux d'expression de MYC en IHC et RT-MLPA

Cette faible corrélation entre IHC et RT-MLPA peut refléter la complexité des anomalies moléculaires ciblant le gène MYC et leurs conséquences au niveau transcriptomique et protéique (Figure 6).

3.5.2 Comparaison des groupes GC et ABC en terme d'expression des ARN IRF4 et MYC

Le score RT-MLPA est le reflet de la différence des niveaux d'expression des gènes d'intérêt pour la classification selon la COO. La comparaison des niveaux d'expression de ces gènes un à un dans les groupes GC ABC et ZG n'a donc pas d'intérêt.

Nous nous sommes néanmoins intéressés à IRF4 (codant pour la protéine MUM1) dans le but de mieux comprendre le reclassement en GC, ABC et ZG des cas CD10+ MUM1+.

Nous avons donc comparé les niveaux d'expression des ARN de IRF4 dans les groupes GC, ABC et ZG, définis en RT-MLPA (Figure 41). Ces niveaux d'expression sont significativement plus élevés dans le groupe ABC que GC (moyennes 1.363 Vs 0.711 p<0,001) et plus élevés dans le groupe ZG que GC (moyennes 1.088 Vs 0.711 p=0,05);

Une expression même forte de IRF4 n'empêche pas l'algorithme de classer dans les groupes GC ou ZG tandis qu'une expression faible de IRF4 n'est jamais observée dans le groupe ABC et a donc une forte valeur prédictive négative pour prédire l'appartenance au groupe ABC. Ce résultat s'accorde donc avec le fait qu'aucun cas CD10+MUM1- (défini avec le seuil IHC MUM1 <30 %) n'ai été reclassé dans le groupe ABC.

Concernant les cas CD10+MUM1+, le seuil de 30% en IHC, définissant la positivité de MUM1 selon Hans , semble peut être trop faible pour discriminer les cas reclassés en ABC (48%) ou GC (33%) en RT-MLPA.

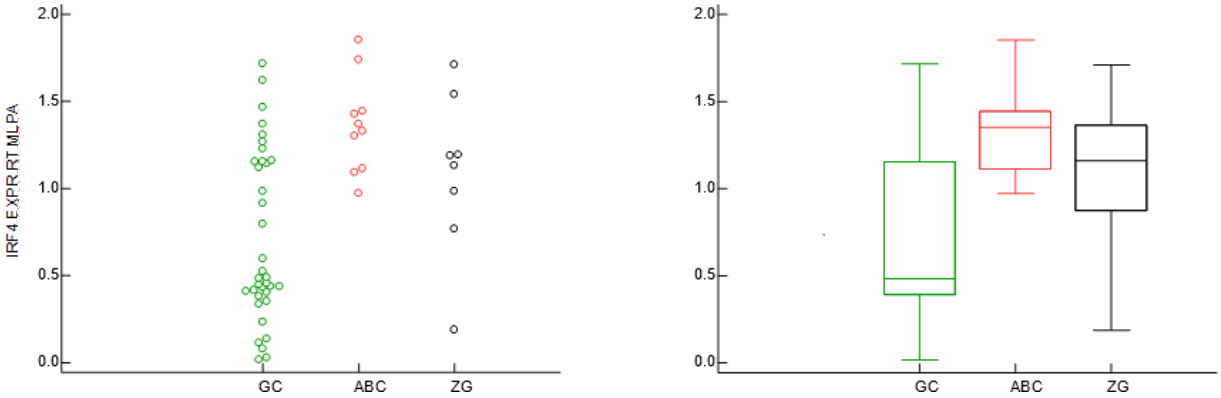


Figure 41: Niveaux d'expression d'IRF4 dans les groupes GC/ABC/ZG définis par la RT-MLPA

Si l'on compare les niveaux d'expression de MYC entres les groupes GC et ABC et ZG (Figure 42), la moyenne du niveau d'expression de MYC n'est pas statistiquement différente entre GC et ABC(1.188 Vs 0.937 p=0,14) bien qu'il semble exister une légère surexpression de MYC dans le groupe GC. En revanche il existe une différence entre les groupes GC et ZG (1.188 Vs 0.692 p=0,01).

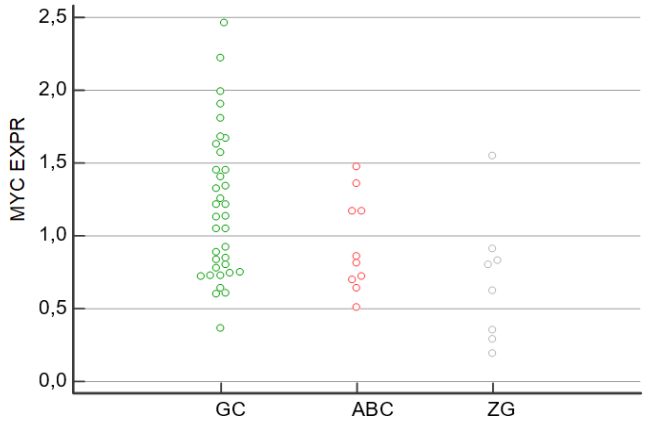


Figure 42: niveaux d'expression des ARN MYC dans les groupes les groupes GC/ABC/ZG définis en RT-MLPA

3.6 Profils cliniques évolutifs

3.6.1 Cohorte globale

3.6.1.1 PFS et OS

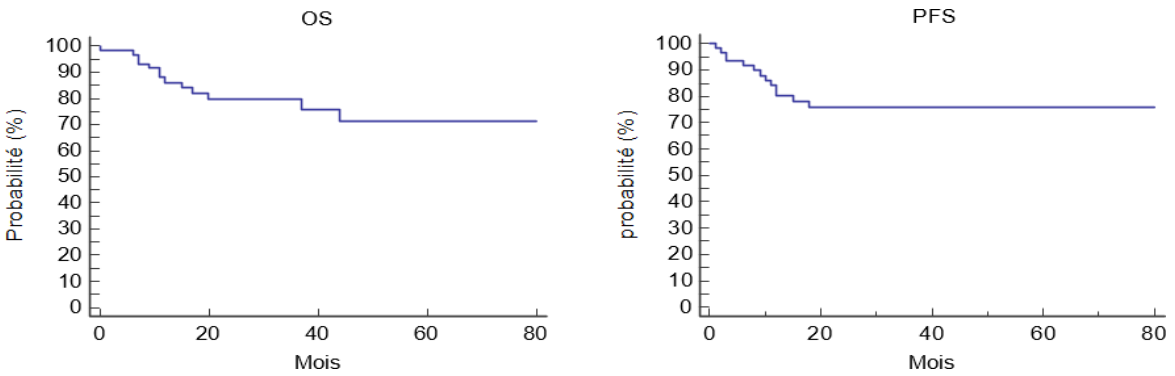


Figure 43: OS et PFS dans la cohorte globale

La PFS et l'OS à 24 mois dans la cohorte globale sont respectivement de 76 % et 80 % (Figure 43).

3.6.1.2 Influence du score IPI sur la survie

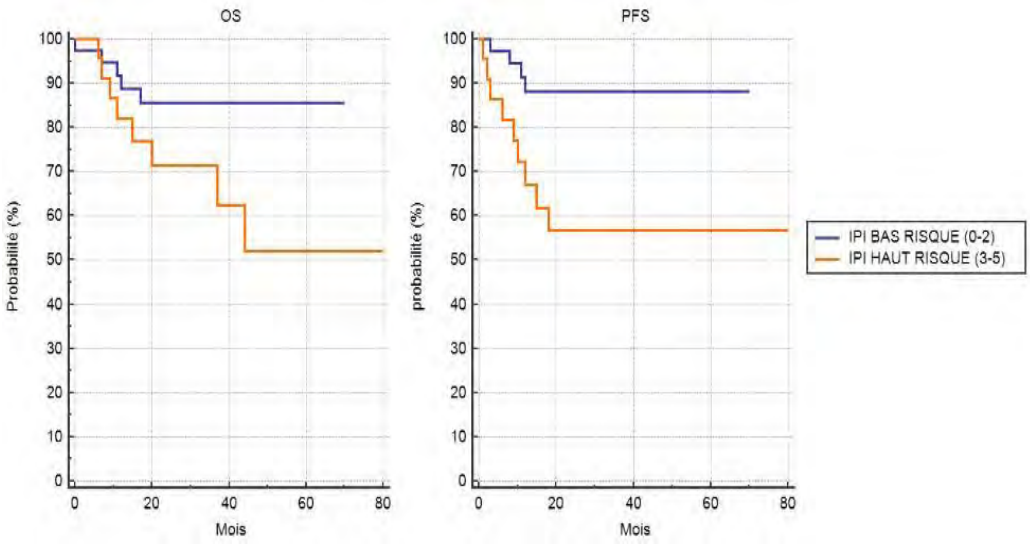


Figure 44: OS et PFS selon l'IPI

Le score IPI permet de stratifier les patients en groupes pronostiques avec une OS à 24 mois de 85% pour le groupe IPI bas risque (score 0-2) et de71% pour le groupe IPI haut risque (score 3-5) (p=0,065). En terme de PFS, cette différence devient statistiquement significative avec 88% pour le groupe bas-risque et 56% pour le groupe haut-risque (p=0,008) (Figure 44).

3.6.1.3 Influence du phénotype DE en IHC sur la survie

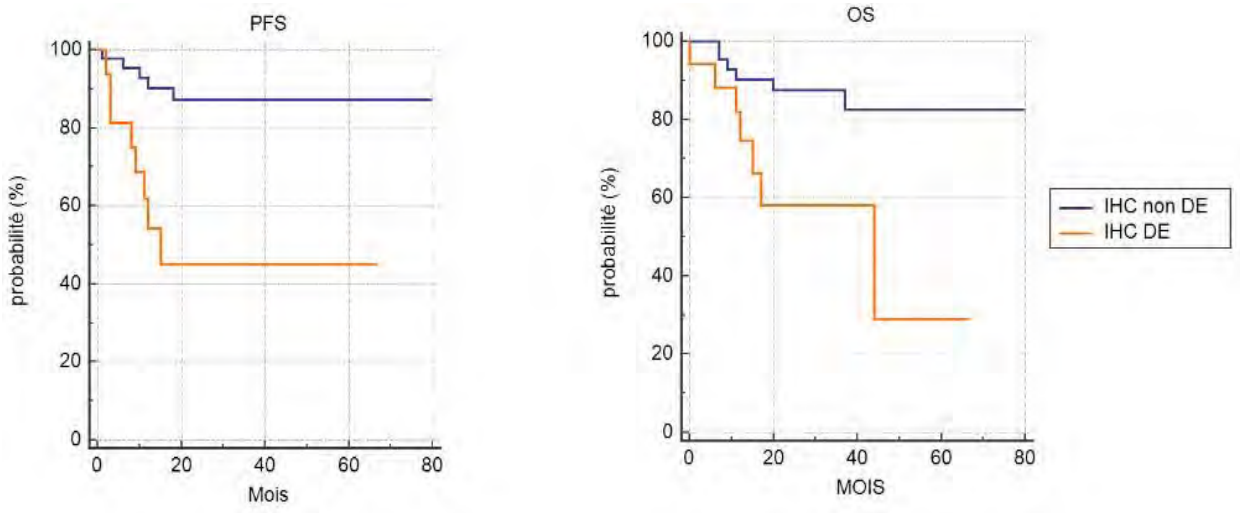


Figure 45: PFS et OS selon le phénotype DE en IHC

Le phénotype DE en IHC est un facteur de mauvais pronostic dans les DLBCL CD10+ avec une OS à 24 mois de 58% Vs 88% (p=0,0057) et une PFS de 45 % Vs 87 % (p=0,0006) (Figure 45).

3.6.2 Groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+

Les faibles effectifs ne nous permettent pas d'analyser l'influence pronostique de l'IPI ou du phénotype DE dans chacun des sous groupes

3.6.2.1 PFS et OS

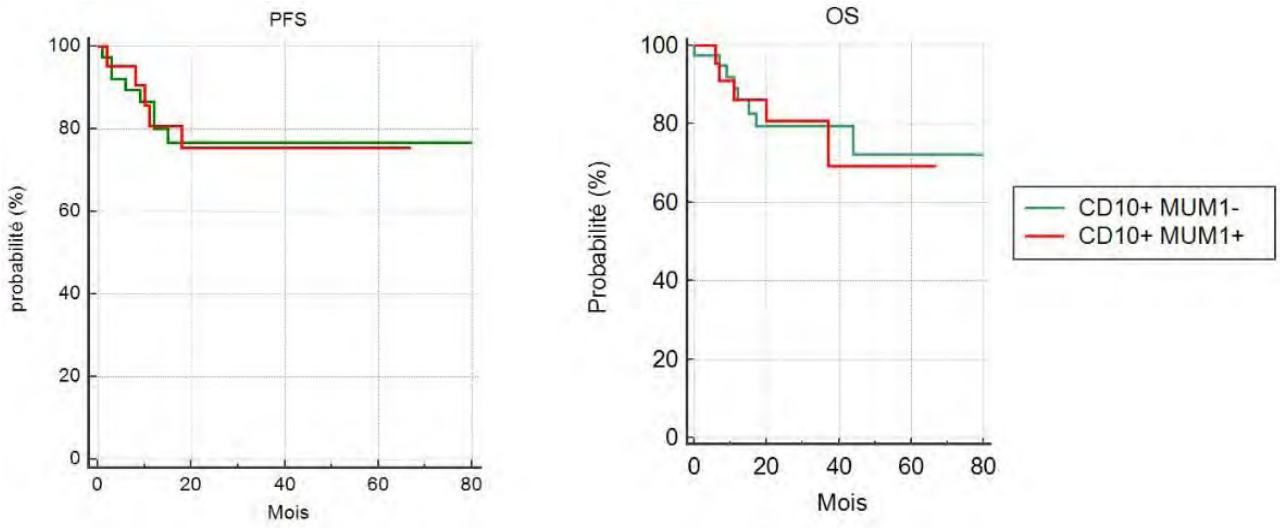


Figure 46: PFS et OS des groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+

Entre les groupes CD10+MUM1- et CD10+MUM1+, il n'est pas observé de différence significative en terme de PFS (76 % et 75 % p=0,96) ou d'OS (79 % et 80 % p=0,91) à 24 mois (Figure 46).

3.6.3 Groupes GC, ABC et ZG en RT-MLPA

Les faibles effectifs ne nous permettent pas d'analyser l'influence pronostique de l'IPI ou du phénotype DE dans chacun des sous groupes

3.6.3.1 PFS et OS

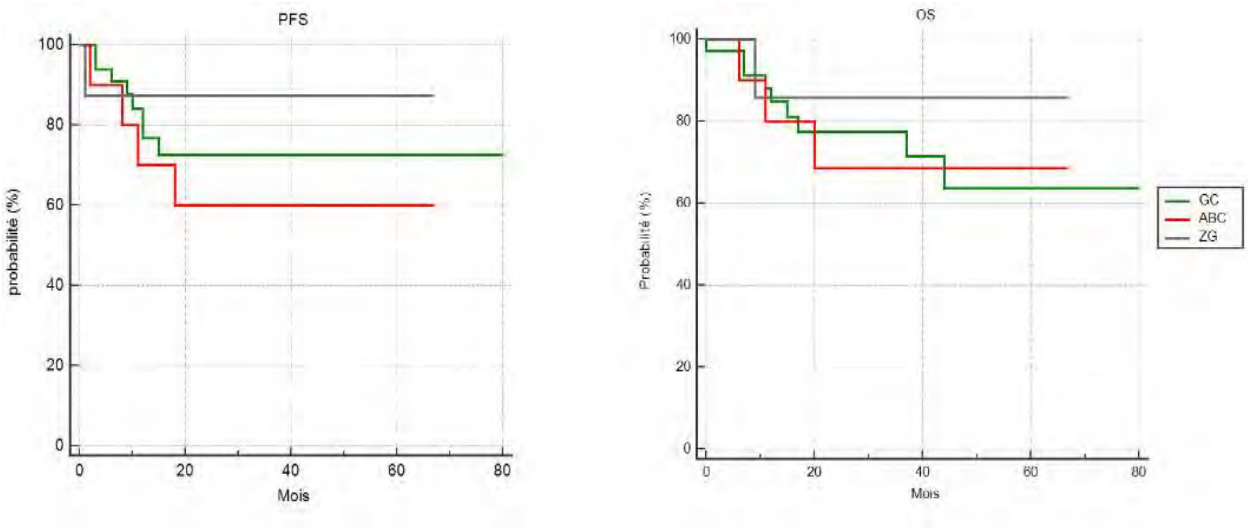


Figure 47: PFS et OS des groupes GC/ABC/ZG définis en RT-MLPA

Les groupes GC, ABC et ZG ne présentent pas de différence significative à 24 mois en terme de PFS (72 % Vs 60 % Vs 87 % p=0,5) ou d'OS (77% Vs 68% Vs 85% p=0,76). Cependant le groupe GC semble avoir un meilleur pronostic en terme de PFS à 24 mois (Figure 47).

4 DISCUSSION

Dans ce travail, nous rapportons pour la première fois les caractéristiques anatomo-cliniques et moléculaires d'un sous groupe de DLBCL NOS *de novo* de type GC selon l'algorithme de Hans, du fait de la positivité du CD10, mais de phénotype aberrant CD10+MUM1+.

Nous montrons que les DLBCL CD10+MUM1+ représentent 35 % des DLBCL NOS. Ils ne se distinguent pas des DLBCL NOS CD10+MUM1- tant sur le plan de la présentation et de l'évolution clinique, que sur le plan morphologique ou phénotypique (expression isolée de MYC, BCL2 ou associée définissant le phénotype DE). Seul le profil moléculaire permettant le classement des DLBCL selon la COO en RT-MLPA les distingue plus précisément. En effet, les DLBCL CD10+MUM1- sont classés majoritairement pour 88 % d'entre eux dans le groupes GC et pour 12 % d'entre eux dans le groupe ZG alors que les DLBCL CD10+MUM1+ constituent un groupe plus hétérogène se divisant en trois groupes: 48 % sont reclassés dans le groupe ABC, 33% dans le groupe GC et 19 % dans le groupe ZG.

4.1 Comparaison des cas CD10+MUM1+ de notre cohorte avec les données de la littérature

La positivité du CD10 est observée dans 20 à 35% des DLBCL en accord avec nos résultats (25%) mais les données concernant le sous-groupe de DLBCL CD10+MUM1+ restent rares et non homogènes. Ce profil n'a été rapporté que dans 4 études avec des fréquences variables comprises entre 2%, 7,2 % 13,3 % et 14,3% des DLBCL respectivement selon Colomo et al(57), Hans et al(30), Lu et al(58) et Chang et al(119) en accord avec nos résultats (8,6%).

Ces cas CD10+MUM1+ sont rarement caractérisés sur le plan anatomo-clinique et jamais sur le plan moléculaire dans la littérature. Colomo et al. ont essayé d'évaluer la valeur pronostique, sans données sur la cellule d'origine par une technique de référence, de 4 immunophénotypes définis GC-CD10+(CD10+/BCL-6+/MUM1-/CD138-); GC-CD10- (CD10-/BCL-6+/MUM1-/CD138-); post GC (CD10-/BCL6+ou-/MUM1+/CD138-); plasmablastique CD10-/BCL-6-/MUM1+/CD138+. Avec un seuil de positivité à 25% pour chaque marqueur , seulement 2% (3/152) étaient CD10+MUM1+ et n'ont pas été caractérisés car considérés comme de phénotype aberrant. L'étude princeps de Hans et al. recense 7,2% de CD10+MUM1+ parmi les DLBCL sans faire état de leur classification moléculaire précise par GEP. En 2016, dans une étude parue dans *Nature Scientific Report* abordant spécifiquement cette question, Lu et al(58) montrent tout d'abord que la classification COO selon l'algorithme de Hans a un impact pronostique péjoratif pour le groupe non-GC en terme d'OS et de PFS. En particulier, les cas CD10+MUM1+ présentent la même évolution clinique péjorative que le groupe non-GC. Cependant, ce profil GC/non-GC n'a pas été vérifié par une approche moléculaire.

4.2 Conséquences pratiques de cette reclassification

L'originalité de notre étude réside effectivement dans la vérification en RT-MLPA de la classification COO de ces DLBCL CD10+MUM1+ par rapport aux DLBCL CD10+MUM1-. Nous

avons profité de la mise en place en routine de la technique de RT-MLPA par le laboratoire d'Hématologie Biologique du CHU avec qui nous travaillons en étroite collaboration, pour utiliser cette technique dans cette étude. En effet, il s'agit d'une technique relativement fiable, robuste et peu coûteuse dont les résultats par rapport à une technique moléculaire de référence ont déjà été validés antérieurement.

Par cette approche, nous montrons que les DLBCL CD10+MUM1-, considérés comme GC sur la base de l'expression du CD10 en IHC, constituent un groupe assez homogène. En effet, 88% d'entre eux sont classés dans le groupe GC en RT-MLPA, avec aucune erreur majeure de classement GC/ABC; les discordances concernent seulement des mouvements vers le groupe ZG (12%). En revanche, les DLBCL CD10+MUM1+ représentent un groupe plus hétérogène puisqu'ils se divisent en trois groupes : 33 % restent dans le groupe GC, 48 % sont reclassés dans le groupe ABC et 19 % sont dans le groupe ZG. Cette étude confirme donc que les cas CD10+MUM1- restent majoritairement bien classés dans le groupe GC en RT MLPA mais que l'approche IHC selon Hans pour définir la COO des cas CD10+MUM1+ est très approximative.

Cette approximation est vraisemblablement le résultat du caractère hiérarchisé de l'approche IHC décrite par Hans. Effectivement, Hans se base sur l'expression de trois protéines en hiérarchisant leur valeur par une approche algorithmique. Il s'agit d'une différence fondamentale puisque lorsque le CD10 est positif, MUM1 n'a aucune valeur selon Hans alors que le niveau d'expression élevé d'IRF4, le gène codant pour MUM1, fait tendre en RT-MLPA le score vers le groupe ABC. En effet, l'approche moléculaire en RT-MLPA n'est pas hiérarchisée puisque le poids de chacun des 8 gènes utilisés pour le calcul du score de probabilité d'appartenance à un groupe est le même. L'analyse de l'expression d'IRF4 dans les groupes GC ABC et ZG de notre cohorte montre que l'expression forte de IRF4 n'empêche pas l'algorithme de classer dans le groupe GC ou ZG. Cette prudence était déjà suggérée par Barrans et al(32) à propos des DLBCL définis GC en IHC du fait de la positivité du CD10+ reclassés ABC selon une méthode de référence (25%, s'approchant donc de la fréquence de reclassement des CD10+ de 19% observée dans notre étude). Ces cas présentaient bien une expression de MME (gène de CD10) en GEP mais cette dernière est contrebalancée par les autres marqueurs ABC. L'erreur de la classification COO en IHC est donc inhérente à l'approche séquentielle de l'algorithme de Hans qui ne couvre pas le paysage moléculaire global.

En pratique, il convient d'interpréter avec précaution le classement d'un DLBCL CD10+ dont le profil IHC est incomplet ou « aberrant » du fait d'une expression de MUM1. Cette précaution est d'autant plus importante que la classification COO a un impact pronostique dans les DLBCL, et pourra influencer la prise en charge thérapeutique des patients avec l'émergence de thérapies spécifiques pour chacun des groupes GC ou ABC. D'ailleurs, nous montrons dans cette étude une tendance au pronostic défavorable des DLBCL de type ABC par rapport aux DLBCL de type GC, alors que nous n'avons retrouvé aucune différence de survie entre les groupes CD10+ MUM1+ et CD10+ MUM1-. Cependant, notre étude s'attachant au groupe GC selon Hans, il était attendu que les cas ABC seraient peu nombreux voire absents. Avec un faible effectif dans le groupe ABC (16%; n=10), le crédit accordé aux analyses statistiques doit rester limité.

Ainsi en routine clinique, nos résultats montrent qu'un profil GC CD10+MUM1- en IHC, avec le seuil de MUM1<30 % comme défini par Hans, semble suffisant pour infirmer le caractère ABC, et classer ce DLBCL dans le groupe GC dans la grande majorité des cas. En revanche, cette approche IHC pour la détermination de la COO est insuffisante pour classer précisément les

DLBCL CD10+MUM1+ qui devraient être considérés « de phénotype COO inclassable ».

Deux nouvelles approches diagnostiques pourraient être envisagées pour remédier à cette impasse: soit l'étude en RT-MLPA de tous les cas CD10+MUM1+, soit une approche IHC plus fine pour ces cas. En effet, notre étude a montré des niveaux d'expression variables mais toujours élevés d'IRF4 dans ce groupe CD10+MUM1+, suggérant qu'un second seuil IHC (défini au-delà de 30%) pour MUM1 pourrait être determiné afin d'identifier au mieux les cas CD10+MUM1+ de type ABC. La détermination de ce seuil IHC pour MUM1 nécessiterait une étude de corrélation plus approfondie entre les niveaux d'expression d'IRF4 et de MUM1 dans ce groupe CD10+MUM1+ ABC vs GC. Ces propositions d'approches diagnostiques pour la RT-MLPA sont schématisées dans la Figure 48.

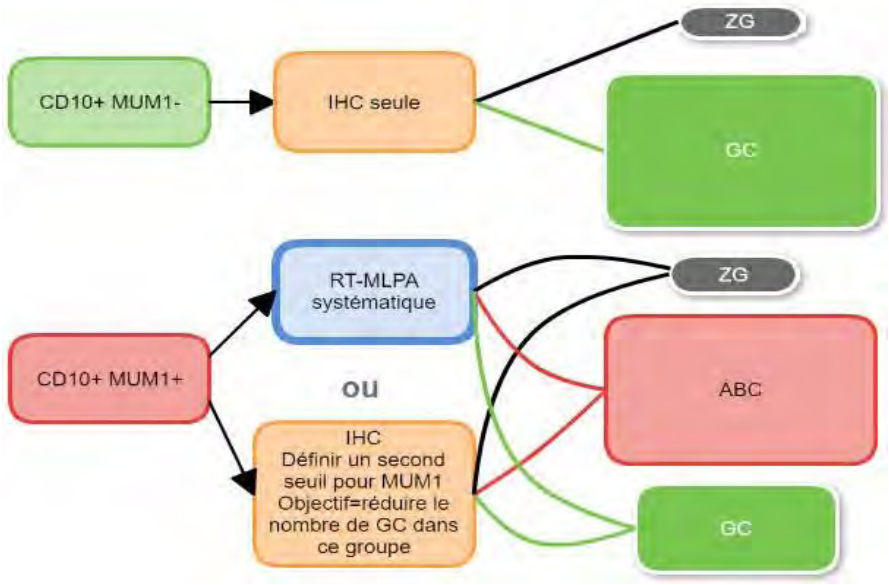


Figure 48: Propositions d'approches diagnostiques pour l'intégration de la RT-MLPA en routine dans la détermination de la COO

4.3 Comparaison des profils d'expression ARN en RT MLPA et protéine en IHC de MYC et BCL2

En ce qui concerne les DLBCL DE, ils sont rapportés dans la littérature avec une fréquence de 20 à 30%. Ils constituent 27% de notre cohorte, sans différence significative de représentation entre le groupe CD10+MUM1- et CD10+MUM1+, mais avec une tendance à l'enrichissement dans le groupe ABC après reclassement des cas, comme rapporté dans la littérature. De plus, nous retrouvons le caractère péjoratif en terme de survie (PFS et OS) de ce profil, comparé aux DLBCL non DE.

Le profil d'expression de ces 2 gènes en RT-MLPA, pourrait également avoir un impact pronostique, à l'instar de leur profil d'expression protéique. En effet, le caractère DE défini en RT-MLPA s'est révélé pronostique dans l'étude de Mareschal et al(95). Cependant les seuils définissant l'hyper-expression sont choisis afin de dégager des groupes pronostiques sans corrélation aux données de l'IHC. Dans notre cohorte, cette concordance entre l'IHC et la RT-MLPA est mauvaise pour MYC et BCL2 et le seuil ARN discriminant des groupes pronostiques reste à définir sur une plus grande cohorte.

4.4 Les limites de la RT-MLPA

Bien que plus fiable que l'approche IHC, la RT-MLPA reste une méthode ancillaire pour approcher la classification selon la COO. La confiance dans la classification de notre cohorte en groupes GC, ABC et ZG doit rester prudente. En effet, la RT MLPA est une technique prometteuse mais dont les limites doivent être connues, en particulier sur matériel FFPE. Dans l'étude princeps de Mareschal et al(95), la RT-MLPA a d'abord offert une concordance de 90 % avec le matériel congelé. Elle a dans un second temps été appliquée sur un plus petit groupe de 28 échantillons FFPE dont la classification sur matériel congelé par une méthode de référence était connue. Les cas mal classés entre GEP et RT MLPA concernaient exclusivement les types GC en GEP qui sont classés en RT-MLPA dans le groupe ZG. Le type ABC en RT-MLPA est toujours bien classé ABC. Ainsi, cette technique semble perdre de sa fiabilité lorsqu'elle caractérise un DLBCL de type GC, sans toutefois faire d'erreur de classement majeure (pas de GC en ABC ni de ABC en GC). Ce groupe ZG mériterait d'ailleurs d'être analysé en profondeur sur le plan du transcriptome et notamment d'être comparé aux DLBCL de type 3 définis en GEP afin de savoir s'il s'agit ou non des mêmes DLBCL.

4.5 Vers une intégration en routine de la RT-MLPA

Concernant l'intégration de la RT-MLPA dans la routine clinique, il est recommandé par l'équipe de Rouen que l'ARN soit extrait dans les 24 heures suivant la coupe tissulaire à 10µ, ce qui implique une contrainte de coordination entre les services d'anatomie pathologique et d'hématologie biologique. Cette recommandation implique, en outre, que les coupes à 10µ soient idéalement réalisées dans le même temps que les coupes destinées à l'étude IHC afin de ne pas épuiser le matériel, en particulier pour les prélèvements biopsiques. Nos résultats montrent qu'au contraire la RT-MLPA est d'une robustesse remarquable et cette contrainte de temps n'est pas justifiée. Le sur-paraffinage à 4° offre les meilleurs résultats pour la conservation au long cours et représente une excellente alternative à la coupe extemporanée, tandis que la conservation des coupes à -80° est à proscrire du fait d'une dégradation notable des ARN.

D'un point de vue budgétaire, le coût est estimé à 5 dollars par test selon Mareschal et al(95). Le service d'hématologie biologique du CHU de Nantes l'estime quant à lui à 13 euros par test pour le panel à 14 gènes. En prenant pour référence l'année 2015, environ 200 cas de DLBCL ont été diagnostiqués au CHU de Nantes. La caractérisation en RT MLPA de la COO pour tous les cas engendrerait un coût en terme de réactifs de 2600 euros, hors fonctionnement de la plateforme, et un temps technique de 51 heures se répartissant en 25 heures d'extraction, 13 heures de RT et 13 heures d'hybridation-ligation-migration. Si les cas CD10+MUM1- étaient considérés GC (ou ZG pour une minorité d'entre eux) et donc sans nécessité de vérification en RT-MLPA, 16 % d'économies seraient attendus sur le coût global et le temps technique. La précision de la classification COO du groupe CD10+MUM1+, qui se divise en GC/ABC ou ZG, prenant en compte une approche IHC plus fine comme proposée plus haut, pourrait encore réduire ce coût si cette nouvelle approche IHC est validée.

Concernant les échecs techniques, ils représentent 11% des cas (n=7/62) de notre cohorte globale. Sept cas ont un profil d'expression très altéré du fait de la dégradation des ARN. Il n'est pas retrouvé de facteur évident pouvant expliquer cette dégradation. Ni l'origine du prélèvement (laboratoires libéraux ou CHU) ni le type (biopsie Vs exérèse chirurgicale) ni la date du prélèvement ne semblent intervenir. Dans l'étude de Mareschal et al(95) puis de Petrella et al(36)

(qui applique la RT-MLPA sur une partie de sa cohorte), les proportions d'échecs sur matériel FFPE sont respectivement de 6,7 % (n=2/28) et 11 % (n=6/56), comparables à celle de notre étude. Les causes de ces échecs ne sont pas détaillées. En pratique pour ces échecs, le tissu cryopréservé serait une alternative envisageable si disponible.

4.6 Limites et perspectives de notre étude

D'une part nous n'avons pas inclus dans cette étude les lymphomes de haut grade NOS ou avec réarrangement des gènes MYC et BCL2 ou BCL6 (une étude cytogénétique par FISH est néanmoins en cours sur une partie des 62 cas exploitables inclus dans cette étude pour vérifier la présence ou non d'un réarrangement). Il serait intéressant de connaître la fréquence exacte du profil CD10+MUM1+ de ces DLBCL agressifs.

Le caractère rétrospectif de cette étude et l'effectif restreint de la cohorte limitant la puissance statistique sont les limites principales de ce travail. Les résultats de cette étude doivent être confirmés à partir d'une cohorte plus large de DLBCL. L'exploitation de la cohorte des DLBCL traités dans le protocole GAINED du LYSA, et parfaitement caractérisés sur le plan morphologique, phénotypique, cytogénétique et moléculaire (avec la technique nCounter de Nanostring Technologies) pourrait être envisagée.

5 BIBLIOGRAPHIE

1. **Weltgesundheitsorganisation, Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer, éditeurs. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues: [... reflects the views of a working group that convened for an Editorial and Consensus Conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, October 25 - 27, 2007]. 4. ed. Lyon: Internat. Agency for Research on Cancer; 2008. 439 p. (World Health Organization classification of tumours).**
2. **Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood. 1 sept 1994;84(5):1361-92.**
3. **Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 19 mai 2016;127(20):2375-90.**
4. **Fisher SG, Fisher RI. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. Oncogene. 23 août 2004;23(38):6524-34.**
5. **Rodriguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. Epidemiology of hematological malignancies. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. janv 2007;18 Suppl 1:i3-8.**
6. **Liu S, Semenciw R, Mao Y. Increasing incidence of non-Hodgkin's lymphoma in Canada, 1970-1996: age-period-cohort analysis. Hematol Oncol. juin 2003;21(2):57-66.**
7. **Friedberg JW, Fisher RI. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Hematol Oncol Clin North Am. oct 2008;22(5):941-52.**
8. **Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. Blood. 11 nov 2010;116(19):3724-34.**
9. **Martelli M, Ferreri AJM, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. Crit Rev Oncol Hematol. août 2013;87(2):146-71.**
10. **Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, Jack A, Meignan M, Lopez-Guillermo A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. sept 2015;26 Suppl 5:v116-125.**
11. **Morton LM, Slager SL, Cerhan JR, Wang SS, Vajdic CM, Skibola CF, et al. Etiologic heterogeneity among non-Hodgkin lymphoma subtypes: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. J Natl Cancer Inst Monogr. août 2014;2014(48):130-44.**
12. **Hoeller S, Tzankov A, Pileri SA, Went P, Dirnhofer S. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in elderly patients is rare in Western populations. Hum Pathol. mars 2010;41(3):352-7.**
13. **Yang TO, Cairns BJ, Reeves GK, Green J, Beral V. Cancer risk among 21st century blood transfusion recipients. Ann Oncol. 1 févr 2017;28(2):393-9.**
14. **Ott G. Aggressive B-cell lymphomas in the update of the 4th edition of the World Health Organization classification of haematopoietic and lymphatic tissues: refinements of the classification, new entities and genetic findings. Br J Haematol. 27 juill 2017;**
15. **Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. Nat Rev Immunol. mars 2015;15(3):172-84.**
16. **Blombery PA, Wall M, Seymour JF. The molecular pathogenesis of B-cell non-Hodgkin lymphoma. Eur J Haematol. oct 2015;95(4):280-93.**
17. **Shaffer AL, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. Annu Rev Immunol. 2012;30:565-610.**
18. **Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED, Hans CP, Tibshirani R, Sehn LH, et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 20 janv 2008;26(3):447-54.**
19. **McHeyzer-Williams LJ, Driver DJ, McHeyzer-Williams MG. Germinal center reaction. Curr Opin Hematol. janv 2001;8(1):52-9.**
20. **Mishra D, Singh S, Narayan G. Role of B Cell Development Marker CD10 in Cancer Progression and**

Prognosis. Mol Biol Int. 2016;2016:4328697.

21. **Slack GW, Gascoyne RD. MYC and aggressive B-cell lymphomas. Adv Anat Pathol. mai 2011;18(3):219-28.**
22. **Calado DP, Sasaki Y, Godinho SA, Pellerin A, Köchert K, Sleckman BP, et al. The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. Nat Immunol. nov 2012;13(11):1092-100.**
23. **Allen CDC, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. Immunity. août 2007;27(2):190-202.**
24. **Gualco G, Weiss LM, Bacchi CE. MUM1/IRF4: A Review. Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM. juill 2010;18(4):301-10.**
25. **Mittrücker HW, Matsuyama T, Grossman A, Kündig TM, Potter J, Shahinian A, et al. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. Science. 24 janv 1997;275(5299):540-3.**
26. **Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Küppers R, et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. Nature. 19 juill 2001;412(6844):341-6.**
27. **Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 3 févr 2000;403(6769):503-11.**
28. **Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med. 20 juin 2002;346(25):1937-47.**
29. **Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 19 août 2003;100(17):9991-6.**
30. **Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Blood. 1 janv 2004;103(1):275-82.**
31. **Lenz G, Wright GW, Emre NCT, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 9 sept 2008;105(36):13520-5.**
32. **Barrans SL, Crouch S, Care MA, Worrillow L, Smith A, Patmore R, et al. Whole genome expression profiling based on paraffin embedded tissue can be used to classify diffuse large B-cell lymphoma and predict clinical outcome. Br J Haematol. nov 2012;159(4):441-53.**
33. **Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, et al. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 10 sept 2015;33(26):2848-56.**
34. **Tsujimoto Y, Ikegaki N, Croce CM. Characterization of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. Oncogene. 1987;2(1):3-7.**
35. **Tsuyama N, Sakata S, Baba S, Mishima Y, Nishimura N, Ueda K, et al. BCL2 expression in DLBCL: reappraisal of immunohistochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation. Blood. 27 juill 2017;130(4):489-500.**
36. **Petrella T, Copie-Bergman C, Brière J, Delarue R, Jardin F, Ruminy P, et al. BCL2 expression but not MYC and BCL2 coexpression predicts survival in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma independently of cell of origin in the phase 3 LNH03-6B trial. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 1 mai 2017;28(5):1042-9.**
37. **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):3452-9.**
38. **Staiger AM, Ziepert M, Horn H, Scott DW, Barth TFE, Bernd H-W, et al. Clinical Impact of the Cell-of-Origin Classification and the MYC/ BCL2 Dual Expresser Status in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated Within Prospective Clinical Trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 19 mai 2017;JCO2016703660.**
39. **Schmidt-Hansen M, Berendse S, Marafioti T, McNamara C. Does cell-of-origin or MYC, BCL2 or BCL6 translocation status provide prognostic information beyond the International Prognostic Index score in**

patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab and chemotherapy? A systematic review. Leuk Lymphoma. 9 févr 2017;1-16.

40. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med. 28 janv 2016;374(4):311-22.

41. 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):2253-63.

42. Culpin RE, Sieniawski M, Angus B, Menon GK, Proctor SJ, Milne P, et al. Prognostic significance of immunohistochemistry-based markers and algorithms in immunochemotherapy-treated diffuse large B cell lymphoma patients. Histopathology. déc 2013;63(6):788-801.

43. Ye Q, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Deng L, Wang X, Manyam GC, et al. Prognostic impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma. Oncotarget. 19 janv 2016;7(3):2401-16.

44. Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. déc 1982;79(24):7837-41.

45. Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, Briere J, Delarue R, Canioni D, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. Blood. 26 nov 2015;126(22):2466-74.

46. Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M, Visco C, Dirnhofer S, Gisin N, et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. juill 2014;27(7):958-71.

47. Sesques P, Johnson NA. Approach to the diagnosis and treatment of high-grade B-cell lymphomas with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements. Blood. 19 janv 2017;129(3):280-8.

48. 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):3360-5.

49. 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):3533-7.

50. Green TM, Nielsen O, de Stricker K, Xu-Monette ZY, Young KH, Møller MB. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. Am J Surg Pathol. avr 2012;36(4):612-9.

51. Kluk MJ, Ho C, Yu H, Chen BJ, Neuberg DS, Dal Cin P, et al. MYC Immunohistochemistry to Identify MYC-Driven B-Cell Lymphomas in Clinical Practice. Am J Clin Pathol. févr 2016;145(2):166-79.

52. Wang XJ, Medeiros LJ, Lin P, Yin CC, Hu S, Thompson MA, et al. MYC cytogenetic status correlates with expression and has prognostic significance in patients with MYC/BCL2 protein double-positive diffuse large B-cell lymphoma. Am J Surg Pathol. sept 2015;39(9):1250-8.

53. Colomo L, Vazquez I, Papaleo N, Espinet B, Ferrer A, Franco C, et al. LMO2-negative Expression Predicts the Presence of MYC Translocations in Aggressive B-Cell Lymphomas. Am J Surg Pathol. 10 mars 2017;

54. Béguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting KL, Rosen M, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. Cancer Cell. 13 mai 2013;23(5):677-92.

55. Karmali R, Gordon LI. Molecular Subtyping in Diffuse Large B Cell Lymphoma: Closer to an Approach of Precision Therapy. Curr Treat Options Oncol. févr 2017;18(2):11.

56. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. Blood. 15 mars 2000;95(6):2084-92.

57. Colomo L, López-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martínez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 1 janv 2003;101(1):78-84.

58. Lu T-X, Miao Y, Wu J-Z, Gong Q-X, Liang J-H, Wang Z, et al. The distinct clinical features and prognosis of the $CD10^{+}MUM1^{+}$ and $CD10^{-}Bcl6^{-}MUM1^{-}$ diffuse large B-cell lymphoma. Sci Rep. 9 févr 2016;6:20465.

59. Berglund M, Thunberg U, Amini R-M, Book M, Roos G, Erlanson M, et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. août 2005;18(8):1113-20.

60. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. J Exp Med. 17 déc 2001;194(12):1861-74.

61. Young RM, Shaffer AL, Phelan JD, Staudt LM. B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma. Semin Hematol. avr 2015;52(2):77-85.

62. Zhang L-H, Kosek J, Wang M, Heise C, Schafer PH, Chopra R. Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B-cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblon expression. Br J Haematol. févr 2013;160(4):487-502.

63. Chiappella A, Santambrogio E, Castellino A, Nicolosi M, Vitolo U. Integrating novel drugs to chemoimmunotherapy in diffuse large B-cell lymphoma. Expert Rev Hematol. août 2017;10(8):697-705.

64. Leonard JP, Kolibaba KS, Reeves JA, Tulpule A, Flinn IW, Kolevska T, et al. Randomized Phase II Study of R-CHOP With or Without Bortezomib in Previously Untreated Patients With Non-Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 sept 2017;JCO2017732784.

65. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. Nat Med. août 2015;21(8):922-6.

66. Pfeifer M, Grau M, Lenze D, Wenzel S-S, Wolf A, Wollert-Wulf B, et al. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 23 juill 2013;110(30):12420-5.

67. INCa. Rapport - Réseaux nationaux pour cancers rares de l'adulte, appui à la décision. 2015.

68. Chaganti S, Illidge T, Barrington S, Mckay P, Linton K, Cwynarski K, et al. Guidelines for the management of diffuse large B-cell lymphoma. Br J Haematol. juill 2016;174(1):43-56.

69. Schmidt MT, Huang Q, Alkan S. Aggressive B-cell lymphomas: a review and practical approach for the practicing pathologist. Adv Anat Pathol. mai 2015;22(3):168-80.

70. 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):4916-25.

71. Westin J, McLaughlin P. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a distinct subset with adverse features, poor failure-free survival and outcome with conventional therapy. Leuk Lymphoma. janv 2010;51(1):161-3.

72. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg M-L, Banham AH, Leppä S. Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. août 2009;22(8):1094-101.

73. Muris JJF, Meijer CJLM, Vos W, van Krieken JHJM, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. J Pathol. avr 2006;208(5):714-23.

74. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 sept 2009;15(17):5494-502.

75. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 10 janv 2011;29(2):200-7.

76. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. Leukemia. sept 2012;26(9):2103-13.

77. Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Arch Pathol Lab Med. mai

2011;135(5):537-43.

78. Ott MM, Horn H, Kaufmann M, Ott G. The Hans classificator does not predict outcome in diffuse large B cell lymphoma in a large multicenter retrospective analysis of R-CHOP treated patients. Leuk Res. mai 2012;36(5):544-5.

79. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. Blood. 5 mai 2011;117(18):4836-43.

80. Castillo JJ, Beltran BE, Song M-K, Ilic I, Leppa S, Nurmi H, et al. The Hans algorithm is not prognostic in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. Leuk Res. avr 2012;36(4):413-7.

81. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, Williams JN, Cohen JB, Flowers CR. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-cell lymphoma survival: A meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. déc 2014;14(6):460-467.e2.

82. Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR, Reeder CB, Foran JM, Nelson GD, et al. Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognostic impact of non-germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-Cell lymphoma: a phase II study. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 20 janv 2015;33(3):251-7.

83. Coutinho R, Clear AJ, Owen A, Wilson A, Matthews J, Lee A, et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapeutic strategies. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 déc 2013;19(24):6686-95.

84. Ladetto M, Buske C, Hutchings M, Dreyling M, Gaidano G, Le Gouill S, et al. ESMO consensus conference on malignant lymphoma: general perspectives and recommendations for prognostic tools in mature B-cell lymphomas and chronic lymphocytic leukaemia. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. déc 2016;27(12):2149-60.

85. 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):3460-7.

86. 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.

87. Oki Y, Noorani M, Lin P, Davis RE, Neelapu SS, Ma L, et al. Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience. Br J Haematol. sept 2014;166(6):891-901.

88. Moore EM, Aggarwal N, Surti U, Swerdlow SH. Further Exploration of the Complexities of Large B-Cell Lymphomas With MYC Abnormalities and the Importance of a Blastoid Morphology. Am J Surg Pathol. 13 juin 2017;

89. Macpherson N, Lesack D, Klasa R, Horsman D, Connors JM, Barnett M, et al. Small noncleaved, non-Burkitt's (Burkit-Like) lymphoma: cytogenetics predict outcome and reflect clinical presentation. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. mai 1999;17(5):1558-67.

90. Niitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. Leukemia. avr 2009;23(4):777-83.

91. 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 U S Can Acad Pathol Inc. janv 2012;25(1):145-56.

92. Burotto M, Berkovits A, Dunleavy K. Double hit lymphoma: from biology to therapeutic implications. Expert Rev Hematol. juill 2016;9(7):669-78.

93. Swerdlow SH. Diagnosis of « double hit » diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. Hematol Am Soc Hematol Educ Program. 5 déc 2014;2014(1):90-9.

94. Friedberg JW. How I treat « Double Hit » lymphoma. Blood. 9 juin 2017;

95. Mareschal S, Ruminy P, Bagacean C, Marchand V, Cornic M, Jais J-P, et al. Accurate Classification of

Germinal Center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and Rapid Reverse Transcriptase-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay: A CALYM Study. J Mol Diagn JMD. 9 avr 2015;

96. **NanoString Technologies. NanoString Technologies, Inc. :: nCounter® Systems Overview [Internet]. SITE. [cité 12 juill 2017]. Disponible sur: https://www.nanostring.com/products/ncounter-systems-overview**
97. **Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih C-J, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Blood. 20 févr 2014;123(8):1214-7.**
98. **Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 15 juin 2002;30(12):e57.**
99. **Eldering E, Spek CA, Aberson HL, Grummels A, Derks IA, de Vos AF, et al. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. Nucleic Acids Res. 1 déc 2003;31(23):e153.**
100. **Leonard DGB, éditeur. Molecular Pathology in Clinical Practice [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cité 13 mars 2017]. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-3- 319-19674-9**
101. **Sylvain Mareschal. Caractérisation multi-omique des Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules. [Rouen]: École doctorale Normande de biologie intégrative, santé, environnement; 2015.**
102. **MRC Holland. MRC-Holland - MLPA Technology - mRNA MLPA (RT-MLPA) [Internet]. [cité 28 juin 2017]. Disponible sur: https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhJtDwbnV_S8wXZEEgPlVeFW64ioHXIqCvA..**
103. **von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. PloS One. 5 déc 2007;2(12):e1261.**
104. **Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 20 sept 2014;32(27):3059-68.**
105. **Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Müeller SP, et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 20 sept 2014;32(27):3048-58.**
106. **Khan AB, Barrington SF, Mikhaeel NG, Hunt AA, Cameron L, Morris T, et al. PET-CT staging of DLBCL accurately identifies and provides new insight into the clinical significance of bone marrow involvement. Blood. 4 juill 2013;122(1):61-7.**
107. **A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. N Engl J Med. 30 sept 1993;329(14):987-94.**
108. **Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M, et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 10 mai 2010;28(14):2373-80.**
109. **Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med. 8 avr 1993;328(14):1002-6.**
110. **Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med. 24 janv 2002;346(4):235-42.**
111. **Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 20 juin 2005;23(18):4117-26.**
112. **Zhao Y, Wang H, Jin S, Zheng J, Huang M, Tang Y, et al. Prognostic analysis of DLBCL patients and the role of upfront ASCT in high-intermediate and high-risk patients. Oncotarget. 21 avr 2017;**
113. **Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, et al. Rituximab plus**

cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. Lancet Lond Engl. 25 mai 2013;381(9880):1817-26.

114. Delarue R, Tilly H, Mounier N, Petrella T, Salles G, Thieblemont C, et al. Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. mai 2013;14(6):525-33.

115. Vitolo U, Trněný M, Belada D, Burke JM, Carella AM, Chua N, et al. Obinutuzumab or Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 10 août 2017;JCO2017733402.

116. Wyndham H. Wilson,. Phase III Randomized Study of R-CHOP Versus DA-EPOCH-R and Molecular Analysis of Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma: CALGB/Alliance 50303 [Internet]. [cité 5 juin 2017]. Disponible sur: https://ash.confex.com/ash/2016/webprogram/Paper97112.html

117. Non-Hodgkin's Lymphomas: Diffuse Large B-Cell Lymphoma version 2.2016 [Internet]. NCCN. 2016 [cité 15 avr 2017]. Disponible sur: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site

118. Maxwell. Maxwell® RSC RNA FFPE Kit [Internet]. [cité 18 juill 2017]. Disponible sur: http://france.promega.com/products/rna-purification-and-analysis/rna-analysis-workflow/rna-purification/maxwell-rsc-rna-ffpe-kit/

119. Chang C-C, McClintock S, Cleveland RP, Trzpuc T, Vesole DH, Logan B, et al. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. Am J Surg Pathol. avr 2004;28(4):464-70.

Vu, le Président du Jury,
(tampon et signature)

Pr Céline BOSSARD

Vu, le Directeur de Thèse,
(tampon et signature)

Pr Céline BOSSARD

Vu, le Doyen de la Faculté,

Professeur Pascale JOLLIET

NOM : LAGHMARI **PRENOM : Othman**

Titre de Thèse : CARACTÉRISATION ANATOMO-CLINIQUE, CYTOGÉNÉTIQUE ET CORRÉLATION AVEC LE PROFIL MOLÉCULAIRE EN RT-MLPA D'UN SOUS TYPE DE LYMPHOME B DIFFUS A GRANDES CELLULES DE PHÉNOTYPE GC ABERRANT CD10+ MUM1+

RÉSUME (10 lignes)

La classification des DLBCL selon la cellule d'origine (COO) en 3 groupes GC, ABC et inclassable a une importance pronostique. En routine, la détermination de la COO repose sur l'immunohistochimie (algorithme de Hans) qui reste approximative. Le but de ce travail est de vérifier la COO par une approche moléculaire validée (RT-MLPA) d'un sous-groupe de DLBCL GC selon Hans mais de phénotype aberrant CD10+MUM1+. A partir d'une cohorte de 62 DLBCL NOS *de novo* CD10+, nous identifions 35% (n=22/62) de cas CD10+MUM1+. Ils ne se distinguent pas des cas CD10+MUM1- sur le plan anatomo-clinique. Cependant leur profil moléculaire, hétérogène en RT-MLPA, permet de les reclasser en 3 groupes: ABC 48 %, GC 33%, inclassables 19%, de pronostic différent. En pratique, il convient d'interpréter avec précaution le classement d'un DLBCL CD10+MUM1+ en immunohistochimie.

MOTS-CLES

LYMPHOMES B DIFFUS A GRANDES CELLULES – CLASSIFICATION SELON LA CELLULE D'ORIGINE – RT-MLPA – GC – ABC – MYC – BCL2 – MUM1 – CD10 – HANS - IMMUNOHISTOCHIMIE