



HAL
open science

Étude de la valeur diagnostique et pronostique d'un profil d'expression génique par la technique de RT-MLPA dans les lymphomes à cellules du manteau

Ophélie Cassuto

► **To cite this version:**

Ophélie Cassuto. Étude de la valeur diagnostique et pronostique d'un profil d'expression génique par la technique de RT-MLPA dans les lymphomes à cellules du manteau. Médecine humaine et pathologie. 2013. dumas-00908885

HAL Id: dumas-00908885

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00908885v1>

Submitted on 25 Nov 2013

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

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

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

ANNEE 2013

N°

**THESE POUR LE DOCTORAT EN
MEDECINE**

(Diplôme d'état)

PAR

Mlle Ophélie CASSUTO

Née le 28 juin 1983 à NICE

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 18 OCTOBRE 2013

**Etude de la valeur diagnostique et pronostique d'un profil
d'expression génique par la technique de RT-MLPA dans les
lymphomes à cellules du manteau**

Président du jury : Monsieur le Professeur Hervé TILLY
Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Fabrice JARDIN
Membres du jury : Madame le Professeur Sophie RAYNAUD
Monsieur le Docteur Christian BASTARD
Monsieur le Docteur Jean-Michel PICQUENOT

ANNEE UNIVERSITAIRE 2012 - 2013
U.F.R. DE MEDECINE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN :	Professeur Pierre FREGER
ASSESEURS :	Professeur Michel GUERBET Professeur Benoit VEBER Professeur Pascal JOLY Professeur Bernard PROUST
DOYENS HONORAIRES :	Professeurs J. BORDE – Ph. LAURET – H. PIGUET – C. THUILLEZ
PROFESSEURS HONORAIRES :	MM. M-P AUGUSTIN – J. ANDRIEU-GUITRANCOURT – M. BENOZIO - J. BORDE – Ph. BRASSEUR – R. COLIN – E. COMOY – J. DALION – S. DESHAYES – C. FESSARD – J.P. FILLASTRE – P. FRIGOT – J. GARNIER – J. HEMET – B. HILLEMAND – G. HUMBERT – J.M. JOUANY – R. LAUMONIER – Ph. LAURET – M. LE FUR – J.P. LEMERCIER – J.P. LEMOINE – M. MAGARD – B. MAITROT – M. MAISONNET – F. MATRAY – P. MITROFANOFF – A.M. ORECCHIONI – P. PASQUIS – H. PIGUET – M. SAMSON – M. SAMSON-DOLLFUS – J.C. SCHRUB – R. SOYER – B. TARDIF-TESTART – J.M. THOMINE – C. THUILLEZ – P. TRON – C. WINCKLER – L.M. WOLF

I - MEDECINE

PROFESSEURS

M. Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie Plastique
M. Bruno BACHY	HCN	Chirurgie pédiatrique
M. Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. Jacques BENICHOU	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
M. Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Guy BONMARCHAND	HCN	Réanimation médicale
M. Olivier BOYER	UFR	Immunologie
M. Jean-François CAILLARD (Surnombre)	HCN	Médecine et santé au Travail
M. François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe CHASSAGNE	HB	Médecine interne (Gériatrie)
M. Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
M. Alain CRIBIER (Surnombre)	HCN	Cardiologie

M. Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
M. Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean - Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et Imagerie Médicale
M. Stéfan DARMONI	HCN	Informatique Médicale/Techniques de communication
M. Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN	HCN	Oto-Rhino-Laryngologie
M. Jean DOUCET	HB	Thérapeutique/Médecine – Interne - Gériatrie.
M. Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
M. Philippe DUCROTTE	HCN	Hépto – Gastro - Entérologie
M. Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie Orthopédique - Traumatologique
M. Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
M. Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mle Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
M. Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
M. Pierre FREGER	HCN	Anatomie/Neurochirurgie
M. Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et Santé au Travail
M. Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie Médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Michel GODIN	HB	Néphrologie
M. Philippe GRISE	HCN	Urologie
M. Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
M. Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
M. Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal JOLY	HCN	Dermato - vénéréologie
M. Jean-Marc KUHN	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie cytologie pathologiques
M. Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
M. Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
M. Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
M. Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
M. Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition
Mle Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
M. Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
M. Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie Cardiaque
M. Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. Eric MALLET (Surnombre)	HCN	Pédiatrie
M. Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mle Isabelle MARIE	HB	Médecine Interne
M. Jean-Paul MARIE	HCN	ORL

M. Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - obstétrique
M. Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
M. Pierre MICHEL	HCN	Hépatologie - Gastro - Entérologie
M. Francis MICHOT	HCN	Chirurgie digestive
M. Bruno MIHOUT (Surnombre)	HCN	Neurologie
M. Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
M. Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
M. Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
M. Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
M. Jean-Marc PERON	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
M. Christian PFISTER	HCN	Urologie
M. Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
M. Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
M. Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
M. François PROUST	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie et méd. du dévelop. et de la reprod.
M. Jean-Christophe RICHARD (Mise en dispo)	HCN	Réanimation Médicale, Médecine d'urgence
M. Horace ROMAN	HCN	Gynécologie Obstétrique
M. Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
M. Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatologie – Gastro
Mme Céline SAVOYE – COLLET	HCN	Imagerie Médicale
M. Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mlle Florence THIBAUT	HCN	Psychiatrie d'adultes
M. Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
M. Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
M. Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. François TRON (Surnombre)	UFR	Immunologie
M. Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
M. Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique
M. Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie Réanimation chirurgicale
M. Pierre VERA	C.B	Biophysique et traitement de l'image
M. Eric VERIN	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
M. Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
M. Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
M. Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
M. Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
M. Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
M. Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mme Catherine HAAS-HUBSCHER	HCN	Anesthésie - Réanimation chirurgicale
M. Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
M. Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie Cellulaire
Mme Lucie MARECHAL-GUYANT	HCN	Neurologie
M. Thomas MOUREZ	HCN	Bactériologie
M. Jean-François MENARD	HCN	Biophysique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et Biologie moléculaire
M. Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
M. Francis ROUSSEL	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais
Mme Cristina BADULESCU	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

M. Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
M. Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
M. Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
M. Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie

M. Jean Pierre GOULLE	Toxicologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX	Physiologie
M. Paul MULDER	Sciences du médicament
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
M. Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
M. Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
M. Jean CHASTANG	Biomathématiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mle Cécile CORBIERE	Biochimie
M. Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mle Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Roseline DUCLOS	Pharmacie Galénique
M. Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
M. François ESTOUR	Chimie Organique
M. Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mle Marie-Laure GROULT	Botanique
M. Hervé HUE	Biophysique et Mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie Galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
M. Rémi VARIN (MCU-PH)	Pharmacie Hospitalière
M. Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme Sandrine **PANCHOU**

Pharmacie Officinale

PROFESSEUR CONTRACTUEL

Mme Elizabeth **DE PAOLIS**

Anglais

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Mazim **MEKAOUI**

Chimie Analytique

Mlle Virginie **OXARAN**

Microbiologie

M. Romy **RAZAKANDRAINIBE**

Parasitologie

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEURS

M. Jean-Loup **HERMIL**

UFR

Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS :

M. Pierre **FAINSILBER**

UFR

Médecine générale

M. Alain **MERCIER**

UFR

Médecine générale

M. Philippe **NGUYEN THANH**

UFR

Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS :

M Emmanuel **LEFEBVRE**

UFR

Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD**

UFR

Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX**

UFR

Médecine générale

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE

Melle Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
M. Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
M. Roland CAPRON	Biophysique
M Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation, Economie de la Santé
Mle Elisabeth CHOSSON	Botanique
M. Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
M. Loïc FAVENNEC	Parasitologie
M. Michel GUERBET	Toxicologie
M. Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
M. Mohamed SKIBA	Pharmacie Galénique
M. Philippe VERITE	Chimie analytique

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

MAITRES DE CONFERENCES

M. Sahil ADRIOUCH	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN	Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline GAILDRAT	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
M. Antoine OVRARD-PASCAUD	Physiologie (Unité Inserm 1096)
Mme Isabelle TOURNIER	Biochimie (UMR 1079)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

M. Serguei FETISSOV	Physiologie (Groupe ADEN)
Mme Su RUAN	Génie Informatique

HCN – Hôpital Charles Nicolle

HB – Hôpital de Bois-Guillaume

CB – Centre Henri Becquerel

CHS – Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR – Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

Par délibération en date du 3 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

REMERCIEMENTS

Au Professeur TILLY, je vous remercie de présider le jury et de me permettre de continuer à me former auprès de vous.

Au Professeur JARDIN, merci de m'avoir proposé ce sujet de thèse, depuis le début de mon internat je peux compter sur toi pour me guider et me transmettre une infime partie de ton immense savoir.

Au Professeur RAYNAUD, je te remercie d'avoir fait le déplacement depuis cette belle ville de NICE. Je te connais depuis toujours et je suis très heureuse que tu sois là pour partager ce moment avec moi.

Au Docteur BASTARD, je vous remercie de participer à ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

Au Docteur PICQUENOT, je vous remercie également de participer à ce jury de thèse. Lors de mon stage en votre compagnie vous m'avez fait aimer l'anatomopathologie.

Tout d'abord je remercie mes parents ;

Papa, comme tu le voulais je suis tes traces pour mon métier mais ne compte pas sur moi pour le reste (sport, art, littérature, politique).

Merci d'être toujours là pour moi et surtout de m'avoir transmis l'amour de cette spécialité.

Maman, merci aussi de m'avoir soutenu, j'ai suivi les traces de papa car ta spécialité est beaucoup trop compliquée pour moi.

Je vous aime

Penelope, ma grande sœur qui s'occupe des enfants, merci d'être devenue au fil des ans aussi bien une sœur qu'une amie. J'espère qu'on sera amené à travailler ensemble dans le futur.

Robin, mon petit frère qui fait un métier auquel je ne comprends rien, merci de me sortir quand j'en ai besoin et merci de penser à mon anniversaire...

A Mila, ma petite nièce adorée

Aux pièces rapportées : Dju que je me coltine depuis plus de 10 ans (mais que j'aime bien quand même), Clémentine une belle sœur parfaite.

A Billie,

Je vous aime aussi

A Aurèlie qui me soutient depuis toujours et à Ulysse mon filleul qu'on a attendu longtemps

A Momo et Louise mes 2 campagnardes préférées

A la zoose, la cohen, lamar, pouf pouf , alien mes copines préférées et bien sur à leur chéris, pacsés, maris Toitoiné, Jim, Réré, Julien

A Kelu le calu avec qui j'ai fait les pires soirées...

A Katia, tu me manques dans le nord !!!!!!!

A Emeulneu, Ragnagna, nico la bocca, redou, le blot avec qui j'ai passé de merveilleux moments pendant mon externat

A tine et phie même si on se voit plus trop vous comptez toujours pour moi

A Marie, Agnes, Nath, émilie, guigui, vincent, Isma, edouard : merci de m'accueillir parmi vous

A Grégoire, nos chemins se sont séparés mais tu compteras toujours pour moi

A mes anciens co-internes qui sont devenus des amis :

Laura (sans oublier bien sur son mari le Dr ARMENGOL) et ses bouts de choux

Sophie et ses grands yeux expressifs

Aurelie, mon âme sœur de l'hématologie

Titou mon amoureux de réanimation (la seule anesthésiste au monde qui sait faire les myélogrammes)

A Olivier mon co-interne préféré de bio...

A Mickael le beau gosse de l'hématologie rouennaise

A Momo et Anne les meilleures pneumologues de réa

A Occiali Moriceau Florent mes anesthésistes au grand cœur

A Clémence la marseillaise bien roulée et Anna mes 2 co internes niçoises

A tous mes co-internes de Radiothérapie : Simone, Lamyaaaaaaaa (tu es la bienvenue dans mon bureau...), Jenny, Laurelyne et Emily

Et bien surs à mes co-internes actuels : Charlotte, Elodie, Maxime, Mathilde et Imène

Sans oublier tous mes copains de l'internat, merci à tous ces petits jeunes (je compte aussi berge et sarah)

A la super unité 918 : Phiphi, Vivi, sylvain sans lesquels ma thèse n'aurait jamais vu le jour

A ma super équipe de recherche de master

A Mr le docteur Patrick AUBERGER, VOUS m'avez fait aimer les sciences, (et le blend) j'espère travailler à nouveau avec VOUS un jour

A Aminou, la petite, Magouille (mon homologue-scientifique), Guigui, Fredo, Arnaud, Sandrine O et Sandrine M, Pascal, Diogo, Laurie ...

A tous les services dans lesquels je suis passée dans l'ordre

Le service d'anapath ave Marie, Soizic, Stan, Mathilde et Benjamin

Sans oublier Marie-Laure et Jacqueline

Le service d'oncologie :

Merci à Olivier, tu m'as fait aimer l'oncogériatrie (je plaisante tu avais compris), merci à Mme Veyret, Cécile, Isabelle, Marianne et Mr BLOT.

Merci aussi à Florian et cristina avec qui je 'ai pas eu la chance de travailler

Et bien sure à toute l'équipe d'IDE et d'AS (Elodie, Amandine, Jean guigui, Isabelle, Stephane...) et à Frédérique et Christine des cadres en or massif.

Le service d'oncopédiatrie :

Merci à Mr le Professeur Vannier de m'avoir fait découvrir une partie de ma spécialité que je ne connaissais pas.

Merci à Pascale, Cécile, Aude et bien sur Nimrod mon beau suédois roux, sans oublier mon petit filhon le plus adulte des pédiatres.

Le service d'hématobiologie :

A Gégé, Marie paule, Marc, Pierre (tadatata chamouni), Mr Lenormand, Catherine, Dany, Mathieu, Fabrice...sans oublier Yohan de biochimie.

Le service de réanimation

Merci à Gaëtan, Christophe, Fabienne, Kevin de m'avoir encadré (j en avais besoin !)

Le service d'hématologie niçois

A Henri que je connais depuis toujours, le rockeur au grand cœur

A JMK pour toutes ces nuits à st roch

A Lionel qui ne change pas avec les années

A Faizeh que je n'ai pas eu la chance de connaître plus longtemps

A Mr le Professeur MOUNIER, réfèrent lymphome du CHU de NICE dont j'ai pu bénéficier des conseils permanents

A mes copines les IDE et AS avec qui j'ai plus rigolé que travaillé : Marine, jojo, Alex (les 2), Marylou, Eva(la nordiste), Christelle, Jean mich mich , Eva du sud, Laetitia, Phiphi...(j'en oublie surement excusez moi)

Bien sur je n'oublie pas Virginie et Thomas les expatriés...

A Sylvie V, Sylvie T, Valérie, Sonia...mes copines du 6ème

A Michelle Q que je n'oublie pas

Au service de radiothérapie

Merci à Mr le Professeur DUBRAY, Mr BENYOUCEF, Chantal, Ovidiu, Seb mon CCA préféré, Mr AUVRAY pour ces blagues mémorables

A Annie, Maryse, Julie, Catherine, Sabrina, Brigitte, Laetitia, Philippe sans oublier coco mon petit rayon de soleil

A tous les manip qui ont supporté mon ignorance technologique

A Didier sans qui mes pauses seraient plus solitaire

Pour finir (le meilleur pour la fin)

Le service d'hématologie

Stephane : mon premier chef, tu m'as formé et j'espère ne pas te decevoir par la suite

Pascal : le raleur au grand cœur

Speedy aspasia : rapide et efficace

Nathalie : tu m'as fait le plus grand compliment le jour ou tu m'as dit que j'étais encore plus exigeante que toi...

Fabrice : encore une fois merci

Hélène, Emilie, Lumi mes jeunes chefs

Marion, la vétérinaire de l'hématologie

Ali mon big boss qui est là pour me faire rire et m'aider, tu vas me manquer...

Nathalie, Marie laure, Carole que je vois peu mais que j'apprécie énormément

A toutes les IDE, AS, secrétaires (Katia, Delphine, Maryvonne, Cyrille, Agnès, Floriane et les nouvelles : merci de comprendre ce que je raconte dans la dictolette je sais que c'est pas évident), Sophie mon IDG préférée, Manu, Evelyne, Sabine, Babeth et bien évidemment Sylvie C même si tu as migré vers les hauteurs.

Merci à tous

TABLES DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	Page 1
INTRODUCTION	Page 4
I. GENERALITES	Page 4
1. <u>Définition</u>	Page 4
2. <u>Epidémiologie</u>	Page 4
3. <u>Facteurs de risques</u>	Page 4
II. ELEMENTS DU DIAGNOSTIC DE LCM	Page 5
1. <u>Présentation clinique</u>	Page 5
2. <u>Cytologie et anatomopathologie</u>	Page 5
3. <u>Immunophénotype</u>	Page 9
4. <u>Cytogénétique et biologie moléculaire</u>	Page 9
5. <u>Formes particulières de LCM</u>	Page 11
6. <u>Diagnostics différentiels</u>	Page 12
III. PHYSIOPATHOLOGIE DU LCM	Page 13
1. <u>Lymphopoïèse B normale</u>	Page 13
2. <u>Origine cellulaire du LCM</u>	Page 15
3. <u>Evènement oncogénique primitif</u>	Page 16
4. <u>Evènements oncogéniques secondaires</u>	Page 17
5. <u>Voies de signalisations dérégulées dans le LCM</u>	Page 18
IV. TRAITEMENT DES LCM	Page 24
1. <u>Sujets jeunes</u>	Page 24
2. <u>Sujets âgés</u>	Page 25
3. <u>Nouvelles approches thérapeutiques dans les LCM en rechute</u>	Page 26
V. FACTEURS PRONOSTIQUES	Page 29
1. <u>Le MIPI</u>	Page 30
2. <u>Le profil d'expression génique</u>	Page 30
3. <u>SOX11</u>	Page 32

OBJECTIFS	Page 33
MATERIELS ET METHODES	Page 34
I. PATIENTS	Page 34
1. <u>Patients avec LCM</u>	Page 34
2. <u>Patients avec LNH/SLP non LCM</u>	Page 35
II. TECHNIQUE DE RT-MLPA	Page 36
1. <u>Principe</u>	Page 36
2. <u>Analyse de la RT-MLPA</u>	Page 37
3. <u>Choix des gènes étudiés</u>	Page 37
III. ANALYSES STATISTIQUES	Page 39
1. <u>Valeur diagnostique du test</u>	Page 39
2. <u>Valeur pronostique du test</u>	Page 39
RESULTATS	Page 40
I. CARACTERISTIQUES CLINICO-BIOLOGIQUES AU DIAGNOSTIC DES PATIENTS ATTEINTS DE LCM	Page 40
II. RESULTATS DE LA RT-MLPA	Page 42
1. <u>Technique</u>	Page 42
2. <u>Expression génique relative</u>	Page 43
III. VALEUR DIAGNOSTIQUE DU TEST	Page 50
IV. VALEUR PRONOSTIQUE DU TEST	Page 56
1. <u>Analyse statistique selon le modèle de Cox</u>	Page 56
2. <u>Clustering hiérarchique</u>	Page 62
DISCUSSION	Page 64
CONCLUSION-PERSPECTIVES	Page 67
ANNEXES	Page 68
BIBLIOGRAPHIE	Page 72

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC : Activated B-cell

ADN : Acide désoxyribonucléique

APC : Adenomatous polyposis coli

ARF : Alternating reading frame

ARN : Acide ribonucléique

ASPM : Abnormal spindle homolog

ATM : Ataxia telangiectasia mutated

ATP : Adénosine-5'-triphosphate

BCL2 : B-cell lymphoma 2

BCR : B cell receptor

BEAM : BCNU-etoposide-aracytine-melphalan

BIRC5 : Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5

BTK : Bruton's tyrosine kinase

CCND1 : Cycline D1

CCND2 : Cycline D2

CD : Cluster de différenciation

CDC2 : Cell division cycle 2

CDC20 : Cell division cycle 20 homolog

CDK : Cyclin dependant kinase

CDKN2A : Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CENPE : Centromere protein E

CENP-F : Centromere Protein F

CGH : Comparative genomic hybridization

CHK : Checkpoint Kinase

CHOP : Cyclophosphamide-hydroxyadriamycine-oncovin-prednisone

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

EBMT : European group for blood and marrow transplantation

ECOG : Eastern cooperative oncology group

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain

FFPE : Formalin-fixed, paraffin-embedded

FISH : Fluorescence in situ hybridization
FLIPI : Follicular lymphoma international pronostic index
GB : Globules blancs
GC : Germinal center
GSK3B : Glycogen synthase kinase 3 beta
HPRT1 : Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
ICT : Irradiation corporelle totale
IFN : Interferon
IGF2BP3 : Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3
IGH : Chaîne lourde des immunoglobulines
IMID : immunomodulateur
IPI : International pronostic index
LCM : Lymphome à cellules du manteau
LDH : Lactate déshydrogénase
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
LNH : Lymphome Non Hodgkinien
MAP : Mitogen-activated protein kinase
MCL1 : Myeloid cell leukemia sequence 1
MDM2 : Mouse double minute 2 homolog
MGG : May Grünwald Giemsa
MIPI : Mantle international pronostic index
MLPA : Multiplex ligation-dependant probe multiplex amplification
mTOR : Mammalian target of rapamycin
MYC : Myelocytomatosis oncogene
NFKB : Nuclear factor kappa B
PCR : Polymerase chain reaction
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase
PTEN : Phosphatase and tensin homolog
QMPSF : Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments
RB : Retinoblastome
RC : Rémission Complète
RCHOP : Rituximab-cyclophosphamide-hydroxyadriamycine-oncovin-prednisone

RDHAP : Rituximab-dexamethasone-haute dose aracytine-cisplatine

RFC : Rituximab-fludarabine-endoxan

RT : Reverse transcriptase

SLP : Syndrome lympho-prolifératif

SOX11 : Sex-determining region Y-box11

TP53 : Tumor protein p53

TORC : Transducer of regulated CREB activity 1

INTRODUCTION

I. GENERALITES

1. Définition

Le Lymphome à cellules du manteau (LCM) est une entité décrite dans la classification WHO comme une prolifération de la lignée B composée de cellules monomorphes de taille petite à moyenne avec un contour nucléaire irrégulier et portant la translocation t(11 ;14)(q13 ;q32) (1).

2. Epidémiologie

Les LCM représentent 3 à 10% des LNH avec une incidence d'environ 0,4 pour 100 000 personnes/an, cette incidence augmentant progressivement avec l'âge passant de 0,07 cas pour 100 000 habitants pour un âge inférieur à 50 ans à 2,78 cas pour 100 000 habitants au-delà de 80 ans (2). L'incidence est également plus élevée chez les caucasiens (0,61/100 000 vs 0,27/100 000 pour les autres ethnies). L'âge moyen de diagnostic se situe vers 68 ans avec une prédominance masculine (sexe ratio environ 3:1) (3).

3. Facteurs de risques

Aucun facteur de risque n'a été clairement identifié.

Le rôle de la stimulation antigénique chronique a été suggéré dans la genèse de ce lymphome (4, 5). Récemment une étude cas témoin a établi une corrélation entre infection à *Borrelia Burgdorferi* et le risque de développer un LCM dans une grande série scandinave (6). Aucune corrélation entre LCM et déficit immunitaire n'a été reportée. Certaines substances chimiques comme les pesticides, solvants, insecticides ont été évoqués comme agents étiologiques de LNH (7). Des cas de LCM familiaux ont été reportés avec un âge de survenue plus précoce pour les apparentés faisant suggérer une prédisposition génétique (8).

II. ELEMENTS DU DIAGNOSTIC DE LCM

1. Présentation clinique

La plupart des patients présentent un syndrome tumoral important avec une polyadénopathie diffuse dans 75 à 100% des cas en fonction des séries.

Il existe très souvent un envahissement médullaire (60 à 90% des sujets) avec un clone tumoral circulant détectable chez 25 à 70% des patients (9).

On retrouve une splénomégalie chez 35 à 75% des patients.

Une atteinte digestive macroscopique le plus souvent multifocale est retrouvée dans 15 à 40% des cas et dans 70% des cas si elle est systématiquement recherchée. L'atteinte digestive peut être isolée, réalisant un tableau de polypose lymphomateuse (atteinte disséminée du tube digestif avec présence de pseudopolypes) qui peut toucher le colon, l'iléon, mais aussi l'estomac.

Il existe de rares cas d'envahissement méningé, représentant moins de 5% des patients, ils sont plus fréquents dans la forme blastoïde (10, 11).

D'autres localisations ont été décrites mais elles sont beaucoup plus rares : peau, poumon, sein...

Au total 80 à 90% des patients sont classés stade III ou IV de la classification d'Ann Arbor au moment du diagnostic (12).

Malgré ces formes disséminées d'emblée, l'état général est souvent conservé avec environ 50% des patients présentant des signes B (13).

Une petite proportion de patients se présente sans syndrome tumoral avec uniquement un envahissement médullaire, une phase circulante et éventuellement une splénomégalie (14).


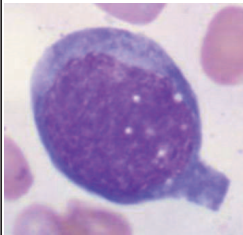
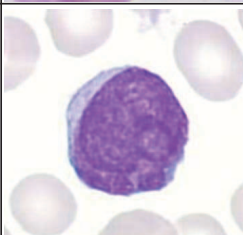
2. Cytologie et anatomopathologie

L'observation au microscope des cellules tumorales a pour objectifs l'identification et la classification selon les critères de la classification des hémopathies malignes de l'OMS 2008.

CARACTÉRISTIQUES CYTOLOGIQUES

Du point de vue cytologique, trois formes de lymphome du manteau sont décrites à partir de prélèvements sanguins, de moelle osseuse et d'appositions ganglionnaires colorés au May Grünwald Giemsa (MGG) : la forme classique qui représente 80 à 90 % des cas, la forme blastoïde (environ 10 % des cas) et la forme pléomorphe. Ces deux dernières sont des formes agressives (15) .

Tableau 1 : Description cytologique des différents sous-types de LCM

Formes	représentation	Description
<u>classique</u>		Cellules du manteau de petite taille au noyau irrégulier, aux indentations larges ou à berges arrondies ; la chromatine est dense, le nucléole peu visible de petite taille à moyenne.
<u>blastoïde</u>		Cellule d'allure blastique à chromatine finement réticulée posant le problème du diagnostic différentiel avec le lymphoblaste.
<u>pléomorphe</u>		Cellules de taille moyenne et hétérogène, au rapport nucléocytoplasmique élevé. Chromatine mature et hétérogène, avec nucléole parfois visible, noyau très irrégulier avec de profondes encoches.

L'avantage de l'analyse cytologique est sa rapidité qui peut donner une piste diagnostique en très peu de temps. Cependant, l'existence de formes à petites cellules, pléomorphes et blastoïdes, qui sont rares, peut poser des problèmes diagnostiques. Dans certains cas, les cellules ont un noyau rond semblable à ceux observés dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) (15).

CARACTÉRISTIQUES HISTOLOGIQUES

Le LCM est caractérisé macroscopiquement par un ganglion avec une surface homogène avec ou sans aspect micronodulaire.

Trois modèles architecturaux microscopiques ont été décrits : infiltration de la zone du manteau (26%), nodulaire (13%), diffus (61%) qui représentent les différents stades d'infiltration tumorale (1, 16-18).

Plus récemment un modèle *in situ* a été ajouté qui est caractérisé par une atteinte localisée au niveau de la zone du manteau (19).

L'atteinte la plus fréquente est représentée par une infiltration diffuse monotone du ganglion par des lymphocytes monomorphes de petite taille à moyenne avec des noyaux plus ou moins irréguliers qui ressemblent à des centrocytes.

Les autres modèles sont définis par la présence de nodules de tailles variables.

Les nodules tumoraux entourent généralement les centres germinatifs qui sont atrophiés.

La population lymphoïde tumorale est également fréquemment accompagnée d'histiocytes épithélioïdes caractéristiques et de petits vaisseaux hyalinisés.

Le LCM peut revêtir différentes formes morphologiques :

-la forme **classique** précédemment décrite

-la forme à **petites cellules** mimant une un lymphome lymphocytaire avec une prolifération monotone de petites cellules avec des noyaux irréguliers et des nucléoles peu marqués. Cette variante morphologique est fréquemment retrouvée chez les patients avec une présentation leucémique associée à une splénomégalie sans atteinte ganglionnaire (14).

-la forme **mimant un lymphome des zones marginales** avec des cellules au cytoplasme clair et abondant.

-la forme **pléomorphe** dont beaucoup de cellules sont grandes avec des contours nucléaires ovales à irréguliers avec un cytoplasme généralement pale et souvent un nucléole proéminent (20, 21).

-la variante **blastoïde** avec des cellules qui ressemblent à des lymphoblastes avec un fort index mitotique (22).

Ces deux dernières formes sont considérées comme de plus mauvais pronostic.

Dans les LCM classiques l'index de prolifération est évalué par le Ki67 en immunohistochimie. L'activité proliférative peut varier mais elle est généralement basse avec un Ki67 aux alentours de 15 à 30%. Dans la variante blastoïde le Ki67 est >40%.

Au niveau de la rate, le LCM efface les centres germinatifs et s'étend à la pulpe rouge (23, 24). Dans les formes leucémiques les sinusoides spléniques sont aussi envahis.

Au niveau de la moelle osseuse le LCM peut avoir une distribution paratrabéculaire, nodulaire ou interstitielle.

Tableau 2 : caractéristiques histologiques des différents sous types de LCM (25)

Classique	-Taille petite à moyenne avec noyau indenté et chromatine modérément dispersée -cytoplasme clair peu abondant -population cellulaire monotone
Petites cellules	-petites cellules rondes ou avec un noyau légèrement indenté avec une chromatine dense (ressemblant à un lymphome lymphocytaire)
Pléomorphe	-Mélange de cellules tumorales avec des noyaux de taille variable ressemblant à un lymphome B à grandes cellules -cytoplasme modéré -chromatine pale
Blastoïde	-cellules monomorphiques de taille moyenne à grande avec une chromatine dispersée ressemblant à un lymphome lymphoblastique -bande cytoplasmique étroite -fréquent corps apoptotiques

3. Immunophénotype

Les cellules du LCM expriment fortement des immunoglobulines de surface, généralement IgM ou IgD, plus fréquemment avec une restriction lambda que kappa.

Les cellules du LCM sont CD5+, CD43+ et expriment des marqueurs B (CD19, CD20, CD22, CD79a and CD79b).

Les cellules tumorales sont généralement négatives pour le CD3, CD23, CD11c, CD10 et BCL6.

Des phénotypes aberrants ont déjà été décrits, parfois associés avec les variantes pléomorphes/blastoïdes ; ces variantes incluent la négativité du CD5 (12% des cas), et la positivité du CD10 (8%), CD23 (21%) (26), bcl-6 (12%), et MUM1 (35%) (27). Une expression forte de Bcl2 peut être observée.

Les cellules tumorales expriment la cycline D1 au niveau nucléaire, cet immunomarquage est associé avec toutes les variantes de ce lymphome, incluant la forme à petites cellules et les formes CD5 négatives.

Récemment l'expression de SOX 11 a été démontrée dans la plupart des LCM et surtout dans les rares cas cycline D1 négative (28, 29).

Lors de l'analyse des résultats de cytométrie de flux, il est indispensable de noter l'intensité d'expression des marqueurs et notamment du CD20 et des immunoglobulines de surface qui sont utiles à la distinction entre LLC et LCM (30).

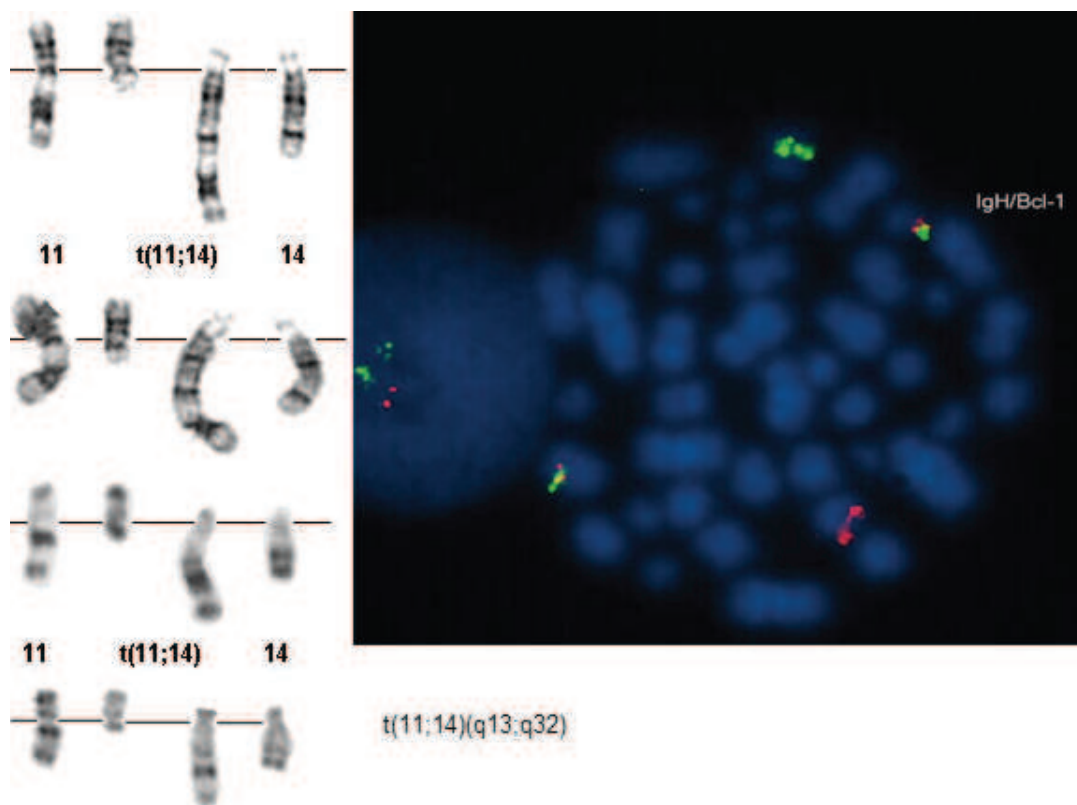
4. Cytogénétique et biologie moléculaire

DIAGNOSTIC CYTOGENETIQUE DU LYMPHOME DU MANTEAU

L'analyse cytogénétique peut permettre de mettre en évidence directement la t(11;14)(q13;q32). La cytogénétique conventionnelle, c'est-à-dire le caryotype, ne révèle cette anomalie que dans environ 65 % des cas (31). Une technique plus sensible comme la FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) permet de rattraper la quasi-totalité des faux négatifs.

Cependant, l'étude du caryotype peut donner des informations complémentaires importantes comme la mise en évidence d'altérations chromosomiques secondaires et la complexité caryotypique observées dans plus de 80 % des LCM. La FISH en interphase est la technique de choix pour mettre en évidence la t(11;14) car plus sensible (détection de 95-100% des cas) et plus spécifique.

Figure 1 : t(11;14)(q13;q32) vue au caryotype et en FISH



DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE LA t(11;14)

Elle peut être détectée par la mise en évidence des points de cassure en 11q13 et en 14q32 en Southern-blot ou en PCR (*Polymerase Chain Reaction*). En PCR classique, les amorces sont dirigées sur la région du point de cassure au niveau du chromosome 11. La PCR est positive dans seulement 20 à 30% des cas du à la vaste région des points de cassure en 11q13, mais lorsque celle-ci est positive, la PCR est un excellent moyen pour le suivi de la maladie résiduelle (32).

5. Formes particulières de LCM

LES LCM INDOLENTS

Les LCM indolents se présentent le plus souvent sans syndrome tumoral à l'exception d'une splénomégalie isolée associée ou pas à une hyperlymphocytose. Les lymphocytes circulants sont monotypiques exprimant tous les marqueurs phénotypiques du LCM en plus de la t(11,14)(33).

L'expression génique comparant les lymphomes du manteau communs et les lymphomes du manteau indolents, retrouve un profil très proche, qui diffère uniquement sur 13 gènes surexprimés dans les formes communes et sous exprimés dans les formes indolentes. Parmi ces 13 gènes, *SOX11* est particulièrement discriminant, ce qui est retrouvé au niveau protéique (34). *SOX 11* est un facteur de transcription impliqué dans le développement embryonnaire du système nerveux central et normalement exprimé uniquement dans les neurones immatures chez l'adulte. Cependant il a été retrouvé surexprimé dans des lymphomes du manteau mais aussi dans des lymphomes de Burkitt, des leucémies aigües lymphoblastiques B et T ainsi que dans des néoplasies solides. Une étude effectuée sur diverses lignées de lymphomes, a montré son rôle dans le contrôle de la croissance tumorale ainsi que dans la méthylation de divers promoteurs (35). Les lymphomes du manteau non tumoraux n'exprimant pas *SOX11* sont donc une forme particulière, probablement individualisée assez tôt dans la lymphomagenèse, avant l'accumulation d'évènements oncogéniques secondaires.

LYMPHOMES DU MANTEAU N'EXPRIMANT PAS LA CYCLINE D1

Dans de rares cas, la t(11;14) n'est pas retrouvée et la cycline D1 n'est pas surexprimée. Ces cas surexpriment en général la cycline D2 ou la cycline D3. Chez certains, on retrouve la t(2;12)(p12;p13) qui met en contact la cycline D2 et le gène de la chaîne légère κ . Chez les autres, le mécanisme de surexpression de la cycline n'est pas connu (36).

Les LCM cycline D1 négatifs expriment dans la quasi-totalité des cas *SOX 11* (29).

6. Diagnostics différentiels

Le LCM est une pathologie de présentation clinique variable par conséquent peu spécifique et sa définition est avant tout biologique. Le diagnostic nécessite une approche multidisciplinaire (études cytologiques, anatomopathologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et de biologie moléculaire) permettant une prise en charge thérapeutique et un suivi adaptés, indispensables dans cette pathologie de mauvais pronostic.

Outre l'existence de cas de LCM cycline D1 négatif, la $t(11;14)(q13;q32)$ peut être observée dans différents désordres lymphoprolifératifs incluant le myélome multiple (15-20%), la LLC atypique (<5%). La surexpression de la cycline D1 est décrite dans la leucémie à tricholeucocytes (50-75% expriment l'ARNm de *CCND1*) (37, 38). Le problème de diagnostic différentiel le plus souvent rencontré est la distinction entre LCM et LLC(14, 39).

Dans ce cas l'immunophénotypage, avec le calcul du score de Matutes, l'étude histologique et l'étude attentive du caryotype sont des outils qui vont aider à la distinction entre ces deux pathologies dont les taux de survie et les pronostics sont considérablement différents.

III. PHYSIOPATHOLOGIE DU LCM

1. La lymphopoïèse B normale

L'analyse des étapes de la lymphopoïèse normale est importante pour la compréhension des mécanismes de la lymphomagénèse B.

LYMPHOPOÏÈSE PRECOCE

La différenciation du lymphocyte B passe par l'obtention d'un récepteur à l'antigène de surface fonctionnel: le BCR (*B-Cell Receptor*), qui comprend entre autre une immunoglobuline (2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères). Le locus des chaînes lourdes se trouve sur le chromosome 14q32 et ceux des chaînes légères sur les chromosomes 2p12 (κ) et 22q11 (λ).

L'étape principale pour obtenir un BCR fonctionnel est le réarrangement des segments d'ADN codant pour les régions variables de chaque chaîne d'immunoglobuline (segments V, D et J), via un mécanisme appelé recombinaison V(D)J. Cette étape marque la progression vers le stade B mature où la cellule exprime un BCR complet et fonctionnel pouvant se lier à l'antigène.

Ces lymphocytes seront caractérisés par la co-expression d'immunoglobulines IgD et IgM membranaires. Quand ceux-ci quittent la moelle osseuse, ils sont encore naïfs et vont coloniser les follicules primaires des organes lymphoïdes secondaires.

LYMPHOPOÏÈSE TARDIVE

Lors de la rencontre avec l'antigène, le lymphocyte B va entrer dans un processus de maturation supplémentaire.

La réponse immune B primaire, est initiée dans la zone T interfolliculaire et implique la coopération entre les lymphocytes B ayant rencontré l'antigène, les lymphocytes T et les cellules dendritiques folliculaires.

Cette première phase correspond à la formation de foyers B blastiques proliférant et se différenciant en plasmocytes de courte durée de vie et sécrétant

des anticorps de faible affinité (IgM). Puis quelques lymphocytes B blastiques peuvent migrer vers un follicule lymphoïde primaire et être à l'origine de la structure spécialisée qu'est le centre germinatif.

Trois phases se succèdent dans le développement du centre germinatif.

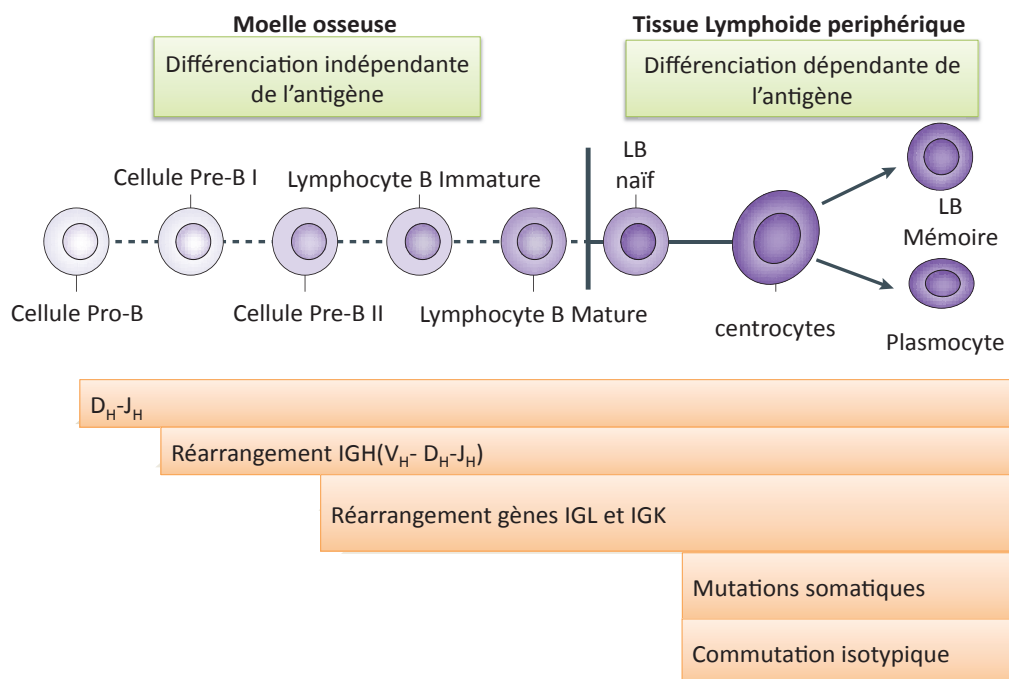
La première correspond à une expansion des lymphocytes B matures ayant rencontrés l'antigène qui se transforment alors en centroblastes.

À ce stade a lieu le processus d'hypermutation somatique, qui permet l'introduction aléatoire de mutations ponctuelles dans les régions variables des gènes codant pour les immunoglobulines.

La deuxième phase correspond à la compartimentalisation de centre germinatif en une zone claire et sombre.

Les centroblastes situés dans la zone sombre se différencient en centrocytes qui migrent vers la périphérie et ne prolifèrent plus. A cette étape, le centrocyte est soumis au processus de commutation isotypique, qui aboutit à la sécrétion d'anticorps de classes et de fonctionnalités différentes (IgG, IgA, IgE), sans altération de la spécificité antigénique.

Figure 2 : La lymphopoïese B normale (40)



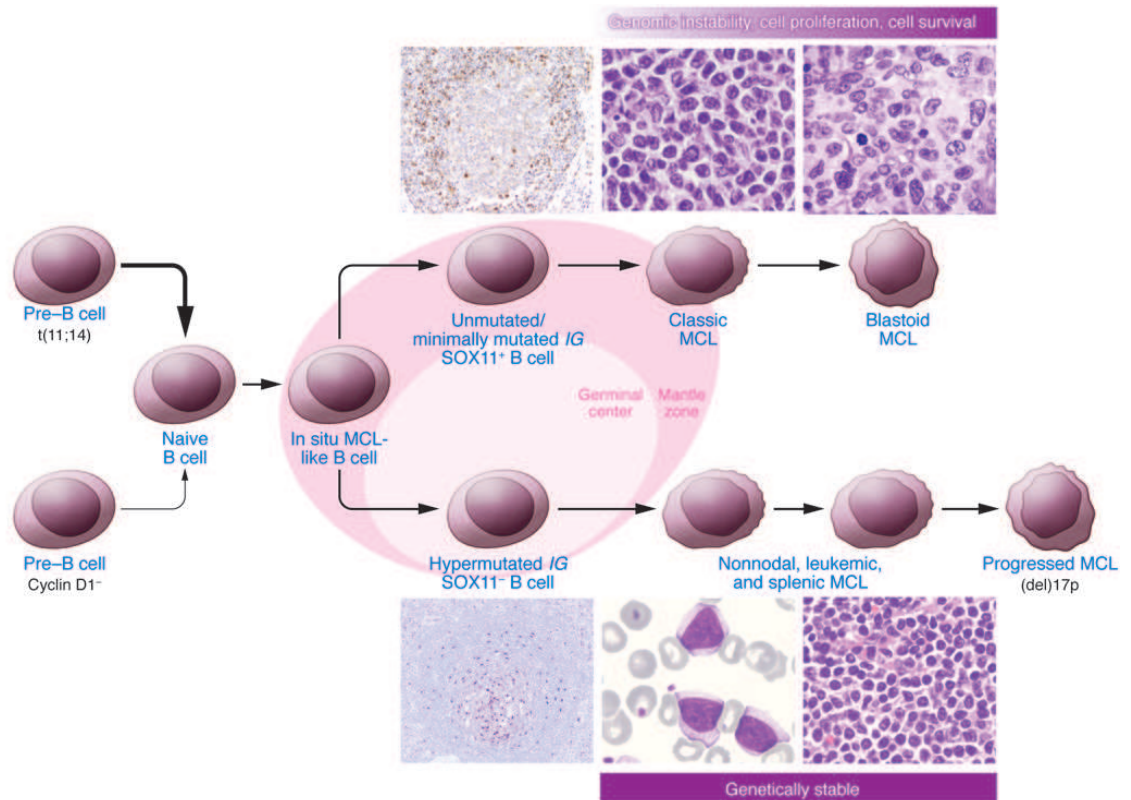
2. Origine cellulaire du LCM (40)

Les lymphocytes du lymphome du manteau dérivent de lymphocytes B matures exprimant des gènes normalement détectés dans les cellules naïves, comme l'IgD et l'antigène CD5. Ainsi bien que la translocation t(11;14) ait lieu dans une cellule B immature dans la moelle osseuse, l'avantage oncogénique qui en découle ne s'exprime qu'au stade de cellule B mature naïve pré-centre germinatif(40). Ces cellules colonisent la zone du manteau des follicules lymphoïdes. La contrepartie normale est une petite population B (2 à 5% des lymphocytes B totaux) présentant le même phénotype CD5+ et colonisant également la zone du manteau. Ce sont des lymphocytes B naïfs produisant des anticorps polyréactifs de faible affinité (41).

Les lymphocytes B dont dérivent les cellules de lymphome du manteau, n'ayant pas rencontré l'antigène, ne devraient pas avoir subi les mécanismes de maturation ayant lieu dans le centre germinatif. Or 15 à 40% des cas de lymphome du manteau présentent des hyper mutations somatiques dans la région des gènes codant pour les immunoglobulines (14, 42-44). Le taux de mutations dans les LCM est inférieur aux autres hémopathies B matures, comme la LLC ou le lymphome folliculaire (45), suggérant une influence moindre du microenvironnement du centre germinatif. Ces données renforcent l'idée d'une cellule naïve mais une partie de la population tumorale pourrait quand même être sous l'influence de la machinerie mutationnelle du centre germinatif.

L'impact du statut mutationnel sur le pronostic des lymphomes du manteau n'est pas clair. Plusieurs équipes suggèrent que les lymphomes du manteau hypermutés auraient un profil moléculaire différent et pourraient être de meilleur pronostic (44, 46-48), mais il existe des données contradictoires dans la littérature (49).

Figure 3 : Origine cellulaire des LCM (50)



3. Evènement oncogénique primitif

Le lymphome du manteau est caractérisé par la translocation t(11;14) (q13;q32) qui juxtapose le proto-oncogène *CCND1* codant pour la cycline D1, situé sur le chromosome 11 et le gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines sur le chromosome 14. Ceci aboutit à un échange de promoteurs et la cycline D1, normalement absente des lymphocytes B normaux (21, 51), se retrouve exprimée dans les lymphocytes tumoraux sous l'influence du promoteur du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines.

La cycline D1 est une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, elle participe normalement au contrôle de la phase G1 et du passage de la phase G1 à la phase S.

Elle forme normalement un complexe avec CDK4 (*Cyclin-Dependent Kinase 4*), ce qui a pour conséquence :

- la phosphorylation et donc l'inactivation de RB1 (RetinoBlastome 1). Ceci libère le facteur de transcription E2F qui facilite le passage de la phase G1 à la phase S. Il a été démontré que RB1 était hyperphosphorylé dans les lymphomes du manteau (52, 53).
- la liaison de p27, un inhibiteur des CDK, au complexe cycline D1/CDK4, ce qui libère le complexe Cycline E/CDK2 qui peut lui aussi inactiver RB1 et libérer E2F.

4. Evènements oncogéniques secondaires

Le lymphome du manteau est donc caractérisé par la translocation t(11;14) et la surexpression de la cycline D1 est nécessaire pour développer ce lymphome mais pas suffisante. Ainsi les souris transgéniques surexprimant la cycline D1 ne développent de lymphome que si un deuxième oncogène, comme *c-Myc*, est dérégulé. Le fait que la translocation t(11;14) ait été retrouvée chez 1 à 2% de la population générale est également un argument pour affirmer que des évènements génétiques secondaires sont nécessaires pour développer un lymphome du manteau.

Par ailleurs, cette hémopathie présente un des taux d'instabilité génétique les plus élevés en particulier dans les formes blastoïdes (31). On retrouve ainsi fréquemment des anomalies caryotypiques avec des pertes et des gains de matériel. Certaines n'ont pas de valeur pronostique (11q-, 13q-) alors que d'autres sont plus fréquemment retrouvées dans les formes agressives : caryotype complexe, 3q+, 12q+, 9p-, 9q, 17p- (31).

L'identification des gènes cibles impliqués par ces anomalies chromosomiques supplémentaires a révélé l'implication de plusieurs voies de signalisation dans la physiopathologie du LCM avec la prolifération cellulaire par dérégulation du cycle cellulaire et la réponse cellulaire aux altérations de l'ADN et de l'induction de l'apoptose.

5. Voies de signalisation dérégulées dans le LCM (54)

La plupart des anomalies chromosomiques citées aboutissent à la dérégulation de deux grandes voies : le cycle cellulaire et les voies de réparation de l'ADN.

DEREGULATION DU CYCLE CELLULAIRE

Les voies INK4a/CDK4, RB1 et ARF/MDM2/p53

Les LCM très prolifératifs et cliniquement agressifs ont des altérations de deux voies majeures de régulation de la prolifération cellulaire, INK4a/CDK4, RB1 et ARF/MDM2/p53(55). La délétion homozygote du locus du gène p16^{INK4a}/p14^{ARF} (locus INK4a/ARF ou locus CDKN2A), situé en 9p21 est détectée dans 20-30 % des cas blastoïdes, mais dans moins de 5 % des cas classiques (56). Sur le plan physiologique, la protéine p16^{INK4a} inhibe les CDK4 et CDK6 et permet ainsi le maintien de la protéine RB1 sous sa forme active, c'est-à-dire hypophosphorylée (57).

La perte de cet inhibiteur de cdk4/6 potentialise l'action de la cycline D1 dans la transition G1/S du cycle cellulaire. Dans les cas de LCM où le locus p16^{INK4a} n'est pas délété, plusieurs études ont montré que le répresseur physiologique de p16^{INK4a}, *BMI-1*, est surexprimé (58). De plus, une amplification de *CDK4* ou des microdélétions de *RB1* avec augmentation de la prolifération cellulaire ont largement été décrites (59).

La délétion du locus p16^{INK4a} entraîne également la perte de la protéine p14^{ARF} (issue de la transcription alternative du gène de p16^{INK4a}) qui participe normalement à la stabilisation de la protéine p53, prévenant sa dégradation médiée par MDM2. Le gène *TP53* est aussi lui-même fréquemment ciblé et altéré dans les LCM, en particulier dans les formes blastoïdes, par délétion 17p (60).

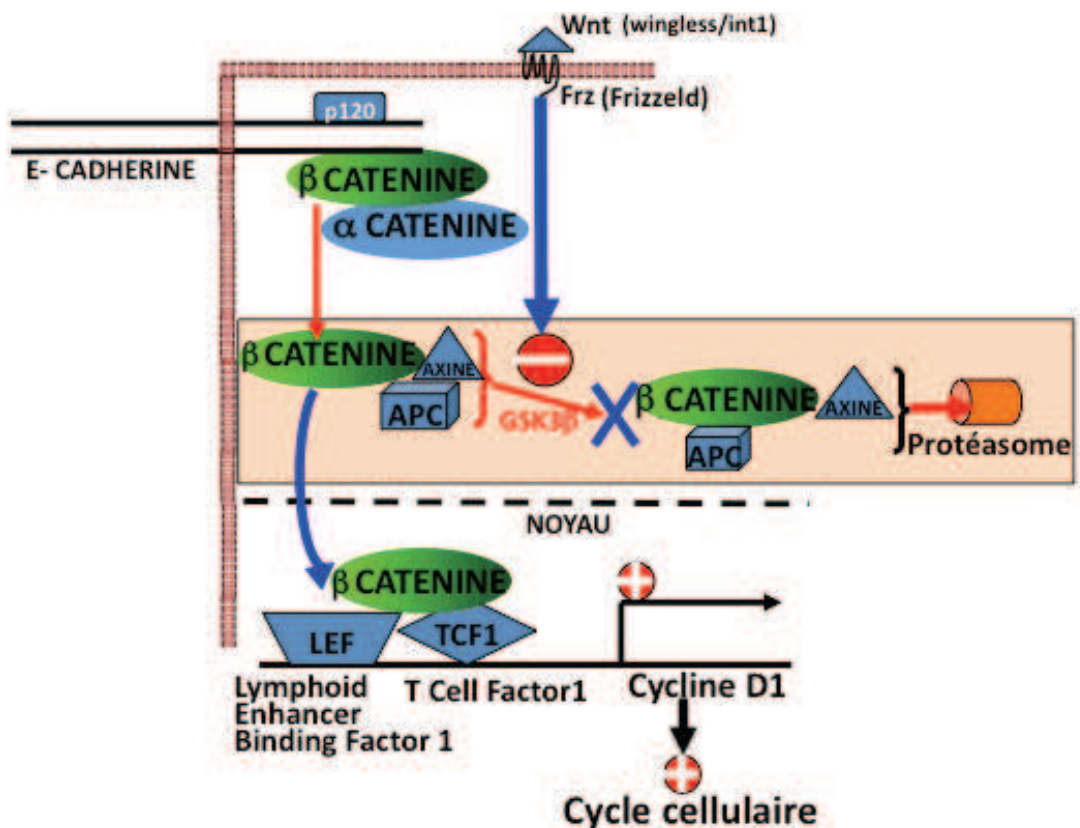
Ces 2 voies sont souvent altérées de façon simultanée, soit par l'association de mutation de *TP53* avec une surexpression de CDK4 ou une inactivation de *RB1*, soit par délétion de CDKN2A. En effet, le locus CDKN2A situé sur le chromosome 9p21 code pour les 2 éléments initiaux de chaque voie.

La voie canonique Wnt-erizing

La voie de signalisation Wnt est une voie de signalisation extrêmement conservée et joue un rôle clé dans l'embryogénèse, mais aussi dans la lymphopoïèse et l'hématopoïèse. La dérégulation des composants de cette voie de signalisation peut être responsable de la transformation cellulaire et a été reconnue comme impliquée dans la physiopathologie de plusieurs types de cancer.

En l'absence d'un signal pour Wnt, la β -caténine est incluse dans un complexe cytoplasmique constitué des protéines axin, GSK3B et APC (*adenomatous polyposis coli*), favorisant sa phosphorylation puis son ubiquitination et finalement sa dégradation par le protéasome. En présence d'un ligand au niveau du récepteur Wnt, la destruction du complexe est inactivée, et la β -caténine transloquée au niveau du noyau pour induire la transcription de ses gènes cibles, en particulier la cycline D1.

Figure 4 : transmission du signal de prolifération par la β -caténine



Il a été récemment démontré que les protéines Wnt3 et Wnt1 étaient surexprimés dans un certain nombre de cas de LCM (61). Il a été aussi trouvé que la protéine β -caténine était localisée non pas au niveau cytoplasmique, mais au niveau du noyau dans 50 % des biopsies de LCM, et que ceci était associé à une augmentation de la forme inactive de GSK3B, avec activation de la transcription de certains gènes, en particulier *CCND1* et *MYC*.

La voie PI3K/ATK/mTOR

La protéine cytoplasmique mTOR assure la coordination des signaux nutritionnels et de la croissance cellulaire par la réception de nombreux signaux, tels que les ceux des facteurs de croissance, des nutriments, de l'énergie (ATP), de l'angiogenèse et du métabolisme cellulaire. Son niveau d'activité kinasique va être dépendant de protéines activatrices comme PI3K (phosphatidyl-inositol-3 kinase) ou inhibitrice comme PTEN. mTOR se trouve localisé au niveau de deux complexes TORC1 et TORC2, et mTORC1 contrôle directement la traduction de régulateurs clés de l'expression de la cycline D1 et MYC. La dérégulation de mTOR est donc un événement majeur dans les LCM, mais non spécifique car elle est fréquente dans la plupart des cancers solides (thyroïde, côlon, cerveau, pancréas, utérus, sein, etc.) (62). Dans les LCM, elle est associée à la perte de l'expression de PTEN et/ou des altérations de la sous-unité catalytique p110 de PI3K.

ALTERATION DES MECANISMES DE REPARATION DE L'ADN

Un des évènements génétiques le plus fréquent, retrouvé dans 50% des cas, est la délétion de la région chromosomique 11q22-23 où se situe le gène *ATM* (*Ataxia-Telangectasia Mutated gene*)(63). La protéine synthétisée par ce gène est une kinase dont le rôle est essentiel à l'activation de la protéine p53 en réponse aux dommages de l'ADN. Après lésion de l'ADN, la protéine ATM intervient dans sa réparation, elle joue également un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire entre autre par phosphorylation de p53.

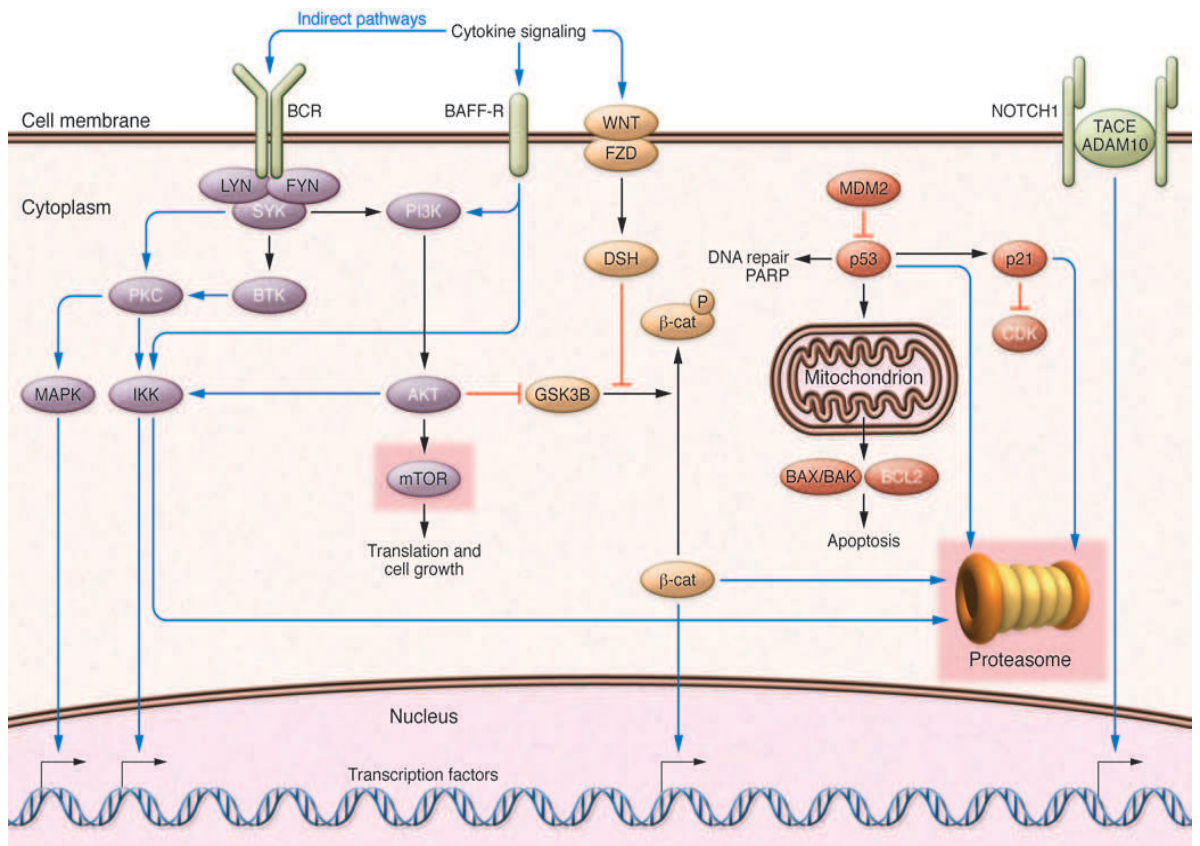
SURVIE CELLULAIRE ET APOPTOSE

De façon additionnelle, d'autres événements secondaires peuvent survenir, au niveau des mécanismes protégeant les cellules de LCM de l'apoptose. L'apoptose est normalement mise en jeu lorsque des lésions de l'ADN surviennent au niveau d'une cellule. Dans les LCM, plusieurs protéines antiapoptotiques (BCL2, IEX-1L, MCL1, etc.) sont surexprimées tandis que les protéines proapoptotiques (caspase 9 et 10, cytochrome 1, etc.) ont une expression diminuée (69). De plus, la voie de **NFKB** qui régule l'expression de nombreux gènes, impliqués dans la survie mais aussi l'apoptose, a été identifiée comme altérée dans des lignées cellulaires mais aussi dans des biopsies tumorales, avec par exemple une hyperexpression du régulateur de l'apoptose FADD. Cet ensemble d'altération va dans le sens d'une altération de l'induction de l'apoptose dans les LCM.

Dans une étude récente, des mutations de **NOTCH1** ont été retrouvées dans 12% des LCM et associées à une survie diminuée (70). Ce gène code pour une protéine transmembranaire. De façon similaire aux mutations décrites dans la LLC, les mutations de **NOTCH1** dans le LCM ont lieu au niveau du domaine PEST et génèrent une protéine tronquée, plus stable et transcriptionnellement active. L'inhibition de cette voie entraîne une diminution de la prolifération et induit l'apoptose (71).

La signalisation via le BCR est également dérégulée avec une surexpression de BTK-phosphorylée (Bruton tyrosine Kinase) (72) ce qui entraîne la survie cellulaire par la voie des MAP Kinases et par la voie NFKB.

Figure 6 : voies de signalisations aberrantes pouvant être ciblées par de nouvelles thérapeutiques (50)



IV. TRAITEMENT DES LCM

1. Sujets jeunes

TRAITEMENT D'INDUCTION

Avant l'ère de l'immunothérapie, le traitement d'induction reposait sur une polychimiothérapie à base d'antracycline (CHOP) avec des taux de remissions complètes autour de 30% (12).

Depuis l'arrivée du rituximab de nombreuses études ont montré son bénéfice en association avec la chimiothérapie (73, 74).

Les dernières études ont montré l'intérêt d'associer de l'aracytine haute dose dans le schéma d'induction (alternance RCHOP/RDHAP) suivi d'une autogreffe (75).

AUTOGREFFE

L'intensification thérapeutique suivie d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) en première rémission complète (RC) a été associée à une amélioration de la survie sans récurrence (76). Ces résultats ont été confirmés avec l'utilisation d'une immunochimiothérapie d'induction (77).

L'autogreffe fait actuellement partie du traitement de référence des sujets jeunes avec cependant un conditionnement non consensuel (78).

En effet, l'utilisation de l'irradiation corporelle totale (ICT) est en nette diminution ces dernières années, cependant une étude du registre de l'EBMT a montré son possible intérêt chez les patients en rémission partielle avant autogreffe comparé à un conditionnement par BEAM (79).

Recommandations

Le groupe européen recommande une induction comprenant de l'aracytine à forte dose suivi d'une autogreffe de CSH comme traitement de référence de l'adulte de moins de 65 ans.

ALLOGREFFE

L'allogreffe est une solution thérapeutique qui peut être proposée aux patients jeunes. Comme dans les autres hémopathies, la toxicité de l'allogreffe limite actuellement le recours de cette approche dans les LCM en première ligne. Une étude rétrospective du Nebraska Lymphoma Study Group a comparé l'allogreffe à l'autogreffe. L'allogreffe diminue le risque de rechute en comparaison à l'autogreffe : 21% à 5 ans comparé à 56 % mais la survie est similaire : 49 % versus 47 % (80). L'ensemble des auteurs s'accorde sur le fait que l'allogreffe n'est pas une option de traitement de première ligne dans les LCM étant donné la comorbidité de la procédure. Par contre, elle est une stratégie efficace à privilégier pour les patients jeunes en rechute ou réfractaire avec un donneur compatible (54).

MAINTENANCE

A la lumière des données de la littérature, la pertinence d'un traitement d'entretien par rituximab est donc une approche attractive dans les MCL ; cependant une seule étude a évalué cette stratégie en première ligne et en post-autogreffe (81).

2. Sujets âgés

Avec un âge moyen de diagnostic entre 60 et 65 ans plus de la moitié des patients sont considérés comme « âgés » au moment de la prise en charge initiale. Bien que le pronostic des patients jeunes ait augmenté ces dernières années avec l'utilisation de l'aracytine haute dose et l'autogreffe, ces modalités thérapeutiques ne sont pas faisables chez des patients de cet âge.

Le traitement des patients âgés nécessite d'évaluer la balance risque/bénéfice entre toxicité et efficacité.

Un bon état général et l'absence de comorbidités sont nécessaires à l'initiation d'un traitement dont le but sera la RC.

De ce fait, l'approche actuelle consiste à séparer les patients âgés en bon état général des patients âgés considérés comme fragiles (82).

SUJETS AGES EN BON ETAT GENERAL

L'intérêt du rituximab a également été montré dans cette population avec une étude randomisée comparant le CHOP au RCHOP (RC 7% vs 34%) mais sans différence en terme de survie sans progression (73).

Une méta-analyse comprenant 3 essais randomisés contrôlés incluant 260 patients retrouve une augmentation de la survie par l'addition de rituximab (74). Seulement une étude randomisée contrôlée a été réalisée chez pour les patients âgés atteints de LCM comparant une induction par RFC ou RCHOP suivi d'une maintenance par rituximab ou interferon (IFN).

Les taux de RC étaient identiques après le traitement d'induction (38% vs 34%) mais le taux de réponses globales était supérieur dans le bras RCHOP (87% vs 78% p=0,05) ainsi que la survie globale.

La maintenance par rituximab a permis de doubler le temps de rémission par rapport à l'IFN mais sans augmenter la survie globale (82).

SUJETS AGES FRAGILES

La chimiothérapie d'induction peut consister en chimiothérapie modérée associée à une immunothérapie comme par exemple du R-Chlorambucil (83, 84).

Un traitement par rituximab seul n'est pas recommandé en induction du fait des faibles taux de réponses (85).

3. Nouvelles approches thérapeutiques dans les LCM en rechute

Durant la dernière décennie, d'importantes avancées ont été réalisées dans la compréhension moléculaire de la lymphomagenèse.

De nombreuses approches ciblées ont pu être explorées dans le LCM (40, 86).

Particulièrement les inhibiteurs de mTor, les inhibiteurs du protéasome, et les immunomodulateurs (IMiDs) ont montré leur efficacité dans les LCM en rechute.

De plus, le récepteur B a récemment été identifié comme une voie cruciale dans le LCM, et les petites molécules ciblant cette voie ont permis l'obtention d'un haut taux de réponse (PCI : Ibrutinib, CAL-101).

TEMSIROLIMUS ET AUTRES INHIBITEURS DE LA VOIE mTOR

Le temsirolimus a permis l'obtention de réponses de 38%-41% dans 2 phases II et plus de 60% en combinaison avec le rituximab (87, 88). Le temsirolimus a l'AMM dans les LCM à partir de la deuxième ligne depuis 2010.

L'everolimus, un autre inhibiteur de la voie mTOR, utilisé principalement comme immunosuppresseur dans la transplantation d'organe, a également montré une efficacité dans une étude de phase II (89).

BORTEZOMIB

L'inhibiteur du protéasome a permis des taux de réponses de 29-46% dans de nombreux essais de phases II incluant un essai international avec plus de 150 patients en rechute (90).

La toxicité est raisonnable mais la survie sans progression médiane est seulement de 6-9 mois.

Des essais ont reporté de longues remissions en combinaison avec une immunothérapie, particulièrement les régimes comprenant de la cytarabine (91, 92).

LENALIDOMIDE

L'immunomodulateur de seconde génération, le lenalidomide a permis des taux de réponses de 38%-50% dans des études de phase II incluant un essai avec 57 patients avec des LCM en rechute (93).

IBRUTINIB

Une étude de phase 2 reportée récemment a permis d'obtenir des taux de RC de 21% et de RP de 47% chez des patients ayant reçu entre 2 et 5 lignes de traitements avec l'inhibiteur de Bruton Kinase (94).

Tableau 3 : Résumé des différentes études sur les nouvelles molécules dans le LCM

Reference	Traitement	Nombre de ligne	Patients	OR/CR(%)	Survie sans progression
Wang L 2011	Temsirolimus 250mg	3	35	38/3	6.5 mois
Ansell SM 2011	Temsirolimus 25 mg, rituximab	2,5	71	59/19	9.7 mois
Renner C 2013	Everolimus 10mg	3	35	20/6	5,5 mois
Hess G 2009	Bortezomib 1.3 mg/m ²	1	155	32/8	6.7 mois
Goy A 2009	Bortezomib 1.5 mg/m ² , R-HAD	4	8	50/25	5.5 mois
Weigert O 2009	Bortezomib 1.3 mg/m ² , R-CHOP	0	36	91/72	64% (2 ans)
Ruan J 2011	Lenalidomide 25 mg	3	57	42/21	5.7 mois
Pérez-Galán P 2011	PCI 3265 560 mg	2	51	69/16	na
Wang M 2013	Ibrutinib 560mg	2	111	68/21	13,9 mois

V. FACTEURS PRONOSTIQUES

Le lymphome du manteau est considéré comme une des néoplasies lymphoïdes les plus agressives et de plus mauvais pronostic avec une médiane de survie de 3-4 ans (32). Cependant, il existe une variabilité au niveau de l'agressivité puisque certains patients vont décéder en moins d'un an tandis que 10 à 15% des patients, présentant une forme indolente, survivent 5 à 10 ans et sont considérés comme des longs survivants (95).

De nombreux critères cliniques, biologiques et histologiques ont été testés quant à leur impact pronostique préthérapeutique. Les variants blastoïdes et pléomorphes ont une évolution plus agressive (40). Les LCM se présentant sous forme exclusivement leucémique ou extraganglionnaire semblent plus indolents (96, 97).

Une grande étude rétrospective sur 350 cas confirmés de LCM a montré que les différents indices de prolifération tels que le score du Ki67 et l'index mitotique sont des marqueurs pronostiques puissants (25, 98).

La présence de mutations au sein des gènes codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines ne modifie pas l'histoire naturelle de la maladie à l'exception de la mutation VH3-21 dont la présence assombrit le pronostic (43, 47).

Des études ont montré la pertinence pronostique de certaines anomalies chromosomiques. La complexité caryotypique et l'augmentation du nombre de gains (gains du 3/3q, 18q) sont associés à une survie globale plus courte (99-101). La délétion du locus INK4a/ARF en 9p21 (*CGHarray*) semble être associée à une survie globale plus courte (13 vs 46 mois) (99, 102).

1. Le MIPI

L'application des index pronostiques internationaux développés pour la prise en charge des lymphomes diffus à grandes cellules (IPI) et folliculaires (FLIPI) (103) s'avère moins pertinente en présence d'un LCM. L'Index pronostique international des lymphomes du manteau (MIPI) tient compte de l'âge du patient, du nombre de globules blancs et de lactate déshydrogénase (LDH) sériques, ainsi que de son indice de performance évalué selon l'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (104). Cet index permet de stratifier les patients en trois cohortes de pronostic différent. Le marqueur de division cellulaire Ki67 permet de distinguer trois sous-populations de LCM d'évolution différente, que les patients soient traités par chimiothérapie ou immunochimiothérapie (98). Incorporé au MIPI (MIPI «biologique»), il en majore la puissance discriminative.

Tableau 4 : score MIPI

Points	Age	ECOG	LDH/Normale supérieure	GB (10 ⁹ /L)
0	<50	0-1	<0,67	<6,7
1	50-59	-	0,67-0,99	6,7-9,999
2	60-69	2-4	1-1,49	10-14,999
3	≥70	-	≥1,50	≥15

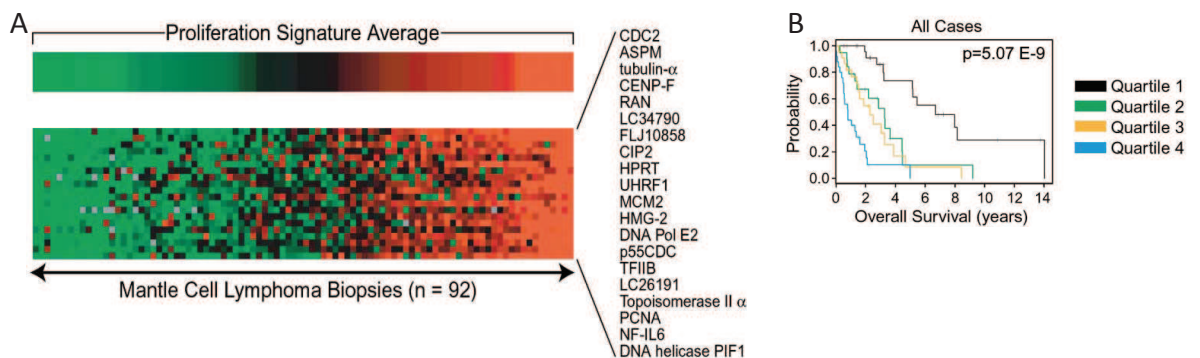
2. Le profil d'expression génique

Le développement et l'utilisation de différentes technologies basées sur les puces/microarrays (*CGHarrays, SNParrays, DNAarrays...*) ont permis l'étude de l'expression et du nombre de copies de milliers de gènes. Les profils d'expression établis sont une aide au diagnostic moléculaire, à la compréhension de la pathogenèse du LCM et permettent de prédire la longueur de la survie des patients présentant un LCM (54, 105).

L'étude de l'expression génique par *Rosenwald et al.* a permis de mettre en évidence d'une part une signature spécifique du LCM différente de celles des lymphomes lymphocytiques, des lymphomes B diffus à grandes cellules et des cellules B activées (« MCL signature genes »). D'autre part, la mesure précise de la prolifération tumorale par l'expression de certains gènes a permis d'identifier un sous-ensemble de patients qui diffèrent de plus de 5 ans au niveau de la médiane de survie avec une significativité statistique importante. La signature de prolifération est composée de 4 gènes s'exprimant à plus fort taux dans les cellules en division que dans les cellules quiescentes et inclus des gènes requis pour la réplication de l'ADN, la progression du cycle cellulaire et les demandes métaboliques nécessaires à la prolifération : *CDC2*, *ASPM* (*Abnormal Spindle-like Microcephal index*), *tubuline α* et *CENP-F* (complexe centromère-kinétochore).

Le sous-type blastique a la plus forte expression pour cette signature de prolifération et la survie la plus courte. Cette signature de prolifération semble par conséquent intéressante comme test pronostic dans le LCM pour la prise en charge thérapeutique en fonction du groupe de risque mais n'est actuellement pas réalisable en routine (techniques longues, chères).

Figure 7 : Profil d'expression génique prédicteur de survie (105)



A : expression relative des 20 gènes de prolifération

B : survie globale en fonction de la signature de prolifération

D'autres études retrouvent un impact pronostic en fonction de l'expression génique (106).

3. SOX11

L'expression de SOX11 est un actuellement un marqueur diagnostique pour les LCM (29). Les LCM indolents se présentant avec une forme leucémique, avec une splénomégalie et sans adénopathie serait SOX11-négatifs et donc de meilleur pronostic, tandis que les formes classiques tumorales agressives seraient SOX11-positives.

L'expression de SOX11 est actuellement étudiée en terme pronostique mais les résultats sont contradictoires (34, 48, 50, 107-110).

OBJECTIFS

Les objectifs de ce travail étaient d'établir la valeur diagnostique et pronostique dans les LCM d'un test basé sur la technique de RT-MLPA (*Reverse transcriptase-multiplex ligation-dependant probe multiplex amplification*)

Le test se base sur la mesure de l'expression relative d'un panel de gènes comprenant:

- des gènes contrôlant la prolifération et le cycle cellulaire (*CDC2, CDC20, CENPE, HPRT1, CCND1, CCND2, ASPM, IGF2BP3*)
- un proto-oncogène (*MYC*),
- un gène suppresseur de tumeur (*CDKN2A*),
- un gène anti-apoptotique (*BCL2*),
- des gènes spécifiques des cellules B (*CD20, IGHM*) et
- le gène *SOX11*, marqueur diagnostique du LCM, récemment identifié.

MATERIELS ET METHODES

I. PATIENTS

1. Patients avec LCM

✓ Critères d'inclusion :

- Entre 2000 et 2011, tous les patients atteints d'un LCM, pour lesquels un ARN provenant d'échantillons tumoraux congelés (biopsie ganglionnaire) conservés au centre Henri Becquerel ont été retenus pour l'analyse moléculaire.
- Pour évaluer la pertinence sur des échantillons biologiques plus anciens des LCM entre 1991 et 2000 avec des biopsies ganglionnaires ont également été analysés.
- Le diagnostic histopathologique a été confirmé par un expert hémopathologiste selon les critères WHO 2008 dans 40 cas. Le caractère blastoïde ou classique du LCM, et l'index de prolifération tumoral (Ki67) ont été notifiés.

✓ Recueil des données clinico-biologiques

Les données cliniques, biologiques et morphologiques ont été recueillies rétrospectivement pour les patients pour lesquels la technique de RT-MLPA a fonctionné.

Elles comprenaient l'âge, le sexe, le nombre de sites tumoraux, l'existence d'une atteinte extra hématologique ou non, l'état général, le type de traitement, les différentes lignes de traitement et la durée de survie.

Les données biologiques comprenaient le taux de LDH, le taux de leucocytes et de lymphocytes.

Pour chaque patient analysé le MIPI a été calculé.

2. Patients avec LNH/SLP non LCM

Afin d'évaluer la pertinence diagnostic du test, 30 patients pour lesquels un diagnostic de lymphome de bas grade autre que celui de LCM (autres lymphomes à petites cellules (LLC, LZM, LP...)) a été retenu ont été analysés et comparés aux cas de LCM.

II. TECHNIQUE DE RT-MLPA

1. Principe (Annexe 1)

La MLPA (*multiplex ligation-dependant probe multiplex amplification*) est une technique permettant la détection de variations de nombre de copies d'un locus(111). Comme la FISH, il s'agit d'une méthode de détection ciblée mais qui possède l'avantage d'étudier un grand nombre de loci simultanément.

Le principe de la technique est d'obtenir pour chaque locus, un fragment amplifié de taille différente afin de les différencier et de les quantifier après électrophorèse. A chaque locus étudié correspond un couple de sondes de taille différente. Ces sondes comportent deux parties : l'une complémentaire de la séquence cible va permettre une hybridation spécifique au niveau du locus étudié, l'autre étant un des deux oligonucléotides commun à chaque couple de sonde va permettre l'amplification par PCR de tous les locus étudiés avec le même couple d'amorces.

La réaction se déroule en trois parties :

- la première partie est l'hybridation : l'ADN génomique dénaturé du patient est mis en présence des couples de sondes qui vont alors s'hybrider spécifiquement à leur séquence cible ;
- la deuxième partie est la ligation : chaque couple de sondes va se lier ;
- la troisième partie est une amplification par PCR multiplex en utilisant un couple d'amorces commun à tous les fragments (complémentaires des 2 oligonucléotides communs). L'utilisation d'un seul couple d'amorce permet d'avoir des conditions d'amplification optimum identiques pour chaque fragment. Une migration des produits d'amplification obtenus est réalisée par électrophorèse sur un séquenceur, afin de séparer les fragments en fonction de la taille et de les quantifier. Chaque fragment peut alors être visualisé sous la forme d'un pic qui, selon son amplitude par rapport au témoin, permet la détection du nombre de copies au niveau d'un locus.

Il existe un nombre important de panels de sondes qui sont utilisés dans des indications très variées.

La RT-MLPA est une variante nécessitant une étape supplémentaire la transcription inverse afin de passer de l'ARN messager à l'ADN codant. Cette étape se fait en amont de la technique de MLPA.

2. Analyse de la RT-MLPA

Les résultats de la RT-MLPA ont été exprimés en données brutes (hauteur des pics) et ont également été normalisés par rapport à la moyenne d'expression de chaque gène pour chaque échantillon.

Ces résultats normalisés ont été utilisés pour l'analyse statistique et les analyses de *clustering*.

3. Choix des gènes étudiés

Les gènes étudiés ont été choisis selon leur intérêt, soit diagnostique, soit pronostique dans les LCM, décrits dans la littérature.

Ces gènes sont connus pour être impliqués dans le mécanisme de prolifération cellulaire (*CDC2, CDC20, CENPE, CCND1, CCND2, HPRT1, ASPM, IGF2BP3, CDKN2A*) en régulant le cycle cellulaire.

Blenk et al. a récemment montré l'intérêt pronostique d'une partie des gènes sélectionnés (*CDC2, CDC20, CENPE, HPRT1, ASPM, IGF2BP3*) (106).

Le Tableau 5 résume les principales caractéristiques des gènes étudiés.

Tableau 5 : Gènes choisis selon les données de la littérature

GENES ETUDIÉS	FONCTION	VALEUR	REFERENCE
CDC2	<i>cell division cycle 2</i> Contrôle l'entrée en phase S, et l'entrée en mitose	Pronostique	(105, 106, 112, 113)
CDC20	<i>cell division cycle 20 homolog</i> Nécessaire à l'anaphase et à la séparation chromosomique	Pronostique	(105, 106, 114)
CENPE	<i>centromere protein E</i> Protéine motrice Kinesine-like accumulée durant la phase G2 pour le mouvement des chromosomes	Pronostique	(106, 115)
CCND1	<i>Cycline D1</i> Transition G1-S	Diagnostique	(116)
CCND2	<i>Cycline D2</i> Transition G1-S	Diagnostique	(117)
CD20	Phosphoprotéine transmembranaire de exprimée à la surface des cellules B	Diagnostique	(116)
HPRT1	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i> Enzyme ayant un rôle central dans la génération des purines	Pronostique	(105, 106)
ASPM	<i>abnormal spindle homolog</i> Essentiel à la fonction du fuseau mitotique	Pronostique	(106, 118)
IGF2BP3	<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3</i> Rôle dans la régulation transcriptionnelle et post transcriptionnelle	Pronostique	(106, 119-121)
IGHM	Chaîne lourde des immunoglobulines M	Diagnostique?	
MYC	Proto-oncogène	Pronostique?	(122-124)
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> Gene suppresseur de tumeur <i>CDKN2A</i> code pour p16 (qui inhibe CDK4-Cycline D) et p14 (qui stabilise p53, en séquestrant mdm2)	Pronostique	(102, 123)
BCL2	Anti-apoptotique	Pronostique?	(122)
SOX11	Développement du système nerveux et rôle dans la tumorigenèse et la neurogenèse adulte	Diagnostique et pronostique	(29, 110, 125)

III. ANALYSES STATISTIQUES

1. Valeur diagnostique du test

Afin d'évaluer l'intérêt diagnostique de notre essai, plusieurs *clustering* hiérarchiques non supervisés ont été réalisés. La significativité statistique des t-tests a été mesurée après correction pour les tests multiples.

La comparaison des médianes d'expression génique relative a été réalisée par le test non-paramétrique de Mann et Whitney.

2. Valeur pronostique du test

La survie a été définie comme la durée séparant le diagnostic du dernier point de suivi vivant ou de la mort, quelle qu'en soit la cause. Seule la survie globale a été analysée.

Le modèle de Cox a été utilisé afin d'identifier les facteurs pronostiques de survie et calculer l'*Hazard Ratio* (HR) avec un index de confiance (IC) à 95%. Des analyses univariées ont d'abord été réalisées.

Les variables associées avec le devenir à un niveau de 5% ont ensuite été incluses dans un modèle de Cox pour une analyse multivariée.

Des *clusterings* hiérarchiques non supervisés ont également été réalisés afin d'identifier différents groupes de survie.

RESULTATS

I. CARACTERISTIQUES CLINICO-BIOLOGIQUES AU DIAGNOSTIC DES PATIENTS ATTEINTS DE LCM

Les données des 56 patients analysés sont détaillées dans le tableau 6.

L'âge au diagnostic était concordant avec les données de la littérature, la majorité de ces patients étaient en bon état général. Ils présentaient un score MIPI élevé pour environ la moitié des cas.

La plupart (81%) présentaient une forme tumorale et seulement 1/3 présentaient une splénomégalie au diagnostic. 67% avaient une atteinte médullaire. 30% d'entre eux avaient une atteinte extra-hématologique.

Sur le plan biologique, un peu plus de la moitié avaient des LDH élevées, 41% avaient une hyperleucocytose et 12% avaient des lymphocytes $> 10G/L$.

Sur le plan anatomopathologique, 15% présentaient une forme blastoïde, Le Ki67 n'était précisé sur le compte rendu anatomopathologique que pour 6 patients avec un $Ki67 > 30\%$ pour 5 patients.

La cycline D1 en IHC était négative dans 16% des cas où elle avait été réalisée.

Sur le plan cytogénétique la $t(11;14)$ a été retrouvée dans 71% des cas et une hyperexpression de la cycline D1 sanguine (11/26) ou au niveau de la biopsie ganglionnaire (12/26) détectée par PCR dans 88% des cas.

Sur le plan thérapeutique, une grande majorité des patients a reçu un traitement contenant du rituximab (83%), 61% ont reçu de l'aracytine et 42% ont été éligibles pour une autogreffe.

Tableau 6 : Caractéristiques des patients atteints de LCM

Caractéristiques des patients LCM	
Sexe ratio M/F	37/19 (66%/44%)
Age diagnostique (médiane)	67
Age biopsie (médiane)	68
ECOG	NA=3
0-1	45 (85%)
≥2	8 (15%)
MIPI	NA=8
Faible	14 (29%)
Intermédiaire	9 (19%)
Elevé	25 (52%)
Splénomégalie	NA=3
Oui	17 (32%)
Non	36 (68%)
Forme tumorale	NA=4
Oui	42 (81%)
Non	10 (19%)
Atteinte extra- hématologique	
Oui	17 (30%)
Non	39 (70%)
LDH>Normale	NA=5
Oui	29 (57%)
Non	22 (43%)
Leucocytes (G/L)	NA=5
<6,7	18 (36%)
6,7-9,9	12 (23%)
10-14,9	12 (23%)
≥15	9 (18%)
Lymphocytes>10 G/L	NA=5
Oui	6 (12%)
Non	45 (88%)
Envahissement MO	NA=4
Oui	35 (67%)
Non	17 (33%)
Morphologie	NA=1
Classique	47 (85%)
Blastoïde	8 (15%)
Ki67	NA=47
<30%	1 (17%)
≥30%	5 (83%)
Cycline d1 (IHC)	NA=13
Positive	36 (84%)
Négative	7 (16%)
Hyperexpression de la cycline D1 (PCR)	NA=30
Oui	23 (88%)
Non	3 (12%)
t(11 ;14)	NA=21
Oui	25 (71%)
Non	10 (29%)
Traitement	NA=2
Aracytine	33 (61%)
Rituximab	45 (83%)
Autogreffe	23 (42%)

II. RESULTATS DE LA RT-MLPA

1. Technique

La technique a été concluante avec l'obtention de pics de fluorescence interprétable pour 97 échantillons /133 (73%).

Afin de déterminer les causes d'échec de la technique la qualité des 36 échantillons sans profil RT-MPLA a été évaluée en RT-PCR par Taqman. Pour ces 36 échantillons, l'expression du gène de ménage *TBP* n'a pas pu être réalisé correctement, témoignant d'une mauvaise qualité de l'ARN et/ou du cDNA.

Ces échecs concernaient principalement des échantillons anciens (> 10 ans) qui ont possiblement été décongelés et recongelés à plusieurs reprises.

Cette technique a été réalisée facilement et a permis d'avoir des résultats sur un grand nombre d'échantillons en moins de 48h.

Avantages de la MLPA

Absence de culture (ADN ou ARN si RT-MLPA)
Multiplexage
Spécificité 100%
Sensibilité 100%
Coût faible
Rapidité (48h)
Adaptabilité à tous types de tissus

2. Expression génique relative

La technique de la RT-MLPA permet d'obtenir une représentation sous forme de pic dont la hauteur (intensité de la fluorescence) est proportionnelle à la quantité de cible présente au départ de la réaction (ANNEXE 2). La hauteur de ce pic a été normalisée par rapport à la moyenne de l'ensemble des pics des gènes étudiés pour chaque patient, permettant d'obtenir une expression génique relative pour chaque gène au sein d'un échantillon donné.

RESULTATS POUR LES LCM

LCM avec hyper-expression de la cycline D1

Parmi nos 56 cas de LCM, 53 présentaient une expression relative de *CCND1*>1. L'expression relative de *CDC2*, *IGF2BP3* et *CDKN2A*, était faible et toujours inférieure à 1. Seul un LCM avait une expression relative de *IGHM* inférieure à 1. Deux LCM avaient une expression génique relative de *HPRT1* et de *CENPE*>1. Quatre LCM avaient une expression relative de *CDC20*>1. Six LCM avaient une expression relative de *ASPM*>1. Dix LCM avaient une expression relative de *CCND2*>1, quatorze avaient une expression relative de *BCL2*>1 et cinq avaient une expression relative de *CD20*>1. Pour le gène *SOX11*, vingt-cinq LCM présentaient une hyper-expression (>1) et 8 avaient une expression relative <0,1 et étaient donc considérés comme *SOX11* négatifs (pic non visible).

L'ensemble des résultats est reporté dans le tableau 7.

LCM sans expression de la cycline D1

Dans notre série, seuls 3 LCM avaient une expression relative de *CCND1*<1. Deux parmi ces 3 patients ne présentaient pas de t(11 ;14) ; l'immunohistochimie ainsi que l'expression de la cycline D1 n'étaient pas disponibles (diagnostic antérieur à 2000). Pour ces échantillons *SOX11* était également négatif, et le diagnostic n'avait pas été confirmé par un expert hématopathe, nous pouvons nous poser la question d'une erreur diagnostique ou d'une entité particulière de LCM(110), le dernier LCM avec une expression relative faible de *CCND1*

présentait une t(11 ;14) et était positif pour la cycline D1 en IHC et positif pour *SOX11* (pic visible).

LCM avec hyper-expression de la cycline D2

10 prélèvements ont une expression relative de *CCND2*>1, la valeur la plus élevée étant de 2,89.

Parmi ces 10 LCM avec une hyper-expression de *CCND2* seuls 4 ont une expression génique relative de *CCND1* inférieure à la moyenne et à la médiane.

Seul un de nos doutes diagnostiques se retrouve classé parmi ces LCM avec hyper-expression de *CCND2*.

LCM sans expression de SOX11

Pour le gène *SOX11*, 8 LCM avaient une expression génique relative de *SOX11* négative (<0,1), comme nous venons de le voir 2 ne sont probablement pas des LCM.

Sur ces 6 patients, un seul se présentait sous une forme indolente au diagnostic et ont tous soit la t(11 ;14) soit une positivité de la cycline D1 en IHC ou une hyper-expression de la cycline D1 en biologie moléculaire.

LCM blastoïdes

Les LCM blastoïdes sont de moins bon pronostic que les formes de LCM classiques (40).

8 (15%) des nos LCM se présentaient sous une forme blastoïde en histologie au diagnostic, 2 de ces LCM blastoïdes avaient une expression relative de *SOX11*<0,1 en RT-MLPA. Un seul avait une expression relative de *CCND1* supérieure à la médiane et à la moyenne.

Pour les autres gènes testés, l'expression relative était variable avec 4 LCM blastoïdes avec une expression relative des *CDC2*, *CENPE*, *IGF2BP3*, *CD20*, *MYC* et *CDC20* inférieure à la médiane, 6 avec une expression relative de *IGHM*, *ASPM* et *HPRT1* inférieure à la médiane.

Pour les gènes *CDKN2A* et *BCL2*, la majorité des LCM blastoïdes (7/8) avaient une expression relative inférieure à la médiane.

Aucun profil type de LCM blastoïde en RT-MLPA n'a pu être mis en évidence dans notre série avec les gènes étudiés.

Lignée cellulaire

Nous avons à notre disposition au laboratoire une lignée cellulaire de LCM obtenue à partir d'un patient (variant blastoïde avec délétion bi-allélique de *CDKN2A*).

La technique de RT-MLPA a également été réalisée sur cette lignée cellulaire.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 8, cette lignée a un pic visible pour l'ensemble des gènes testés excepté *CDKN2A*.

En terme d'expression relative, les gènes *CDC2*, *CENPE*, *CDC20*, *IGF2BP3*, *MYC* et *CD20* avaient une expression supérieure à la médiane et à la moyenne de notre série de 56 LCM.

Les autres gènes avaient une expression inférieure à la moyenne et à la médiane de notre échantillon.

Figure 8 : Profil d'expression génique en RT-MLPA de la lignée REC

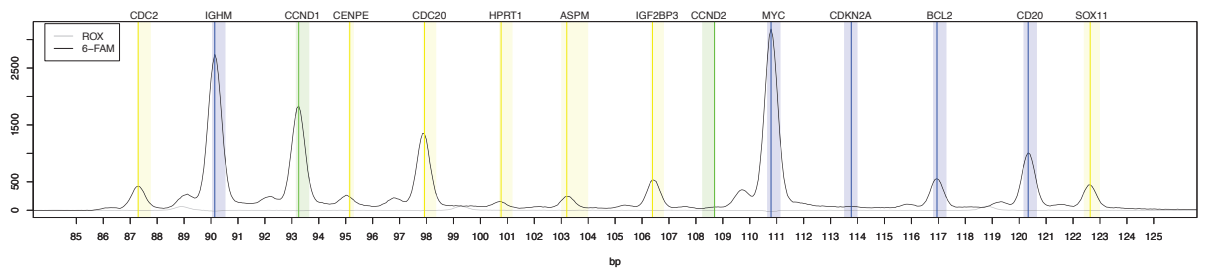
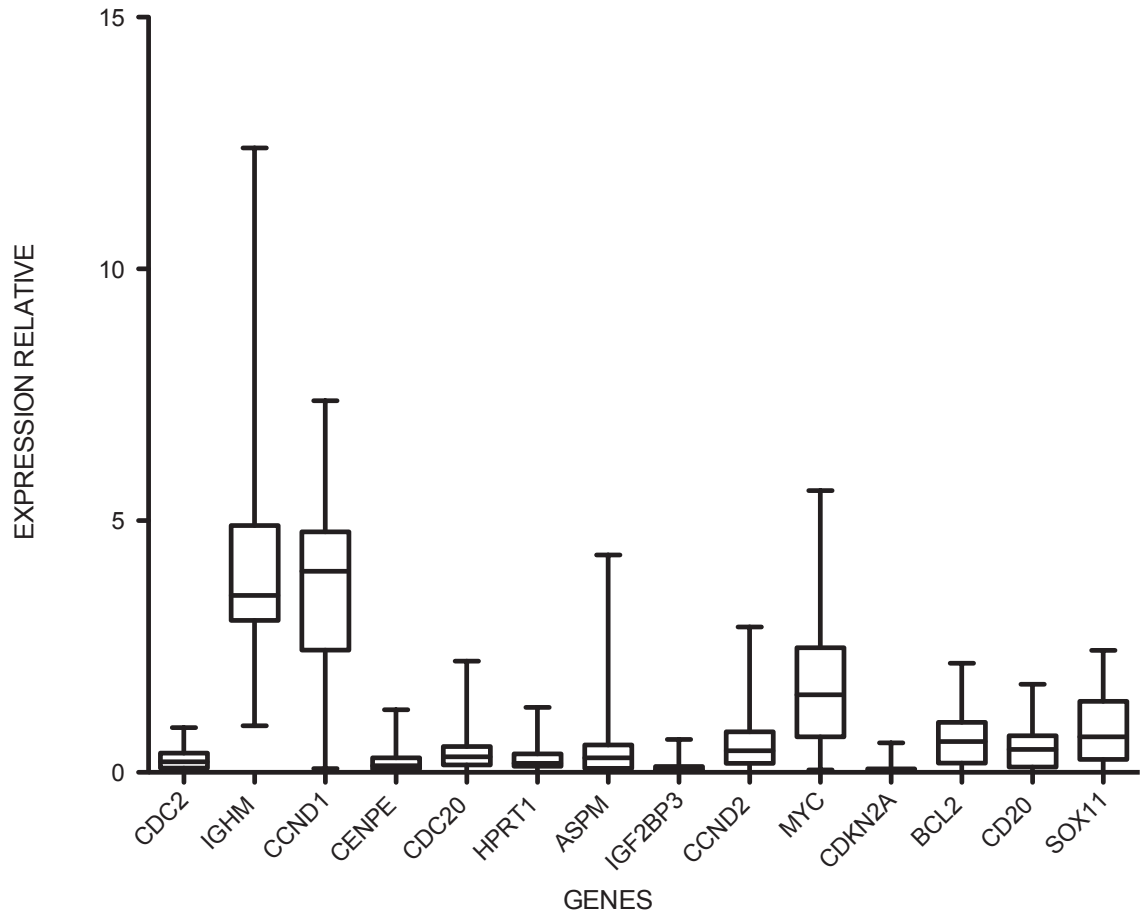


Tableau 7 : Expression génique relative de l'ensemble des gènes dans la population LCM

	Min	Max	Médiane	moyenne
<i>CDC2</i>	-0,05409	0,8874	0,2113	0,2653
<i>IGHM</i>	0,9271	12,40	3,513	4,039
<i>CCND1</i>	0,07539	7,384	3,995	3,743
<i>CENPE</i>	-0,04709	1,244	0,1328	0,2084
<i>CDC20</i>	-0,02196	2,211	0,3116	0,4293
<i>HPRT1</i>	-0,01680	1,290	0,1814	0,2843
<i>ASPM</i>	0,008484	4,319	0,2918	0,5435
<i>IGF2BP3</i>	-0,08653	0,6538	0,04733	0,08612
<i>CCND2</i>	-0,08035	2,889	0,4328	0,5936
<i>MYC</i>	0,05179	5,597	1,544	1,798
<i>CDKN2A</i>	-0,09053	0,5880	0,03010	0,05245
<i>BCL2</i>	-0,05170	2,171	0,6116	0,6232
<i>CD20</i>	-0,07770	1,749	0,4544	0,4683
<i>SOX11</i>	-0,04335	2,424	0,7080	0,8646

Figure 9 : Box plot représentant l'expression génique relative de l'ensemble de gènes étudiés dans les LCM



RESULTATS POUR LES LNH/SLP NON LCM

Pour les LNH/SLP non LCM, l'expression génique relative de *SOX11* était toujours <0,1 (maximale : 0,03320).

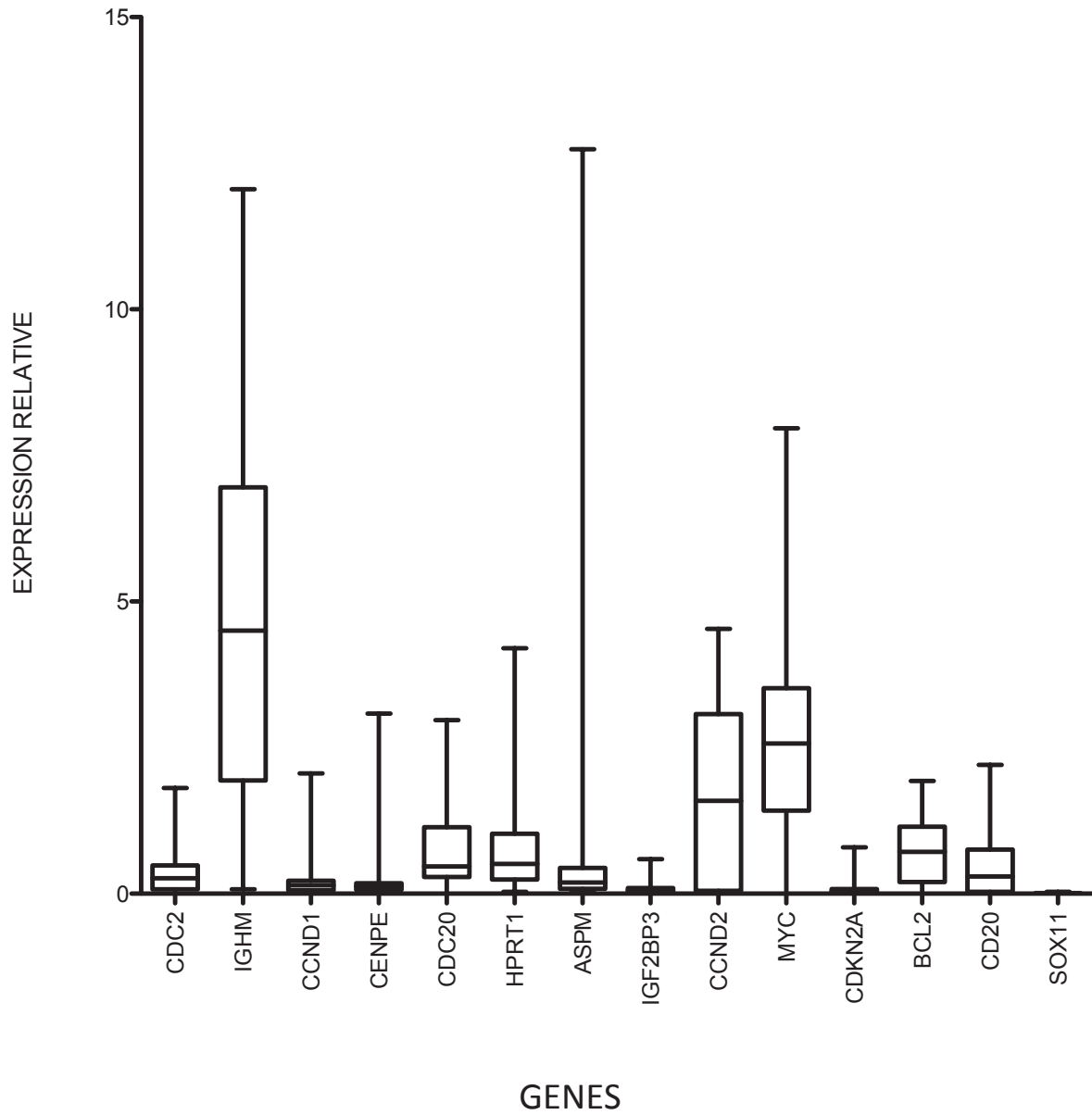
La médiane d'expression génique relative pour le gène de la cycline D1 est inférieure (0,14 vs 3,9).

L'expression de *IGF2BP3* était également <1, de même pour le gène *CDKN2A*.

Tableau 8 : Expression génique relative de l'ensemble des gènes dans la population non LCM

	Min	Max	Médiane	moyenne
<i>CDC2</i>	-0,09445	1,809	0,2634	0,3908
<i>IGHM</i>	0,07337	12,06	4,503	4,892
<i>CCND1</i>	-0,2583	2,060	0,1456	0,2131
<i>CENPE</i>	-0,08737	3,083	0,1243	0,3084
<i>CDC20</i>	-0,02130	2,971	0,4685	0,7613
<i>HPRT1</i>	0,03041	4,198	0,5110	0,7438
<i>ASPM</i>	0,02442	12,74	0,1910	1,216
<i>IGF2BP3</i>	-0,1063	0,5908	0,06020	0,07791
<i>CCND2</i>	-0,07182	4,533	1,591	1,695
<i>MYC</i>	-0,2078	7,964	2,568	2,468
<i>CDKN2A</i>	-0,2299	0,7929	0,04288	0,05270
<i>BCL2</i>	-0,1897	1,929	0,7171	0,7340
<i>CD20</i>	-0,1706	2,205	0,2965	0,4630
<i>SOX11</i>	-0,1891	0,03320	-0,002855	-0,01660

Figure 10 : Box plot représentant l'expression génique relative de l'ensemble de gènes étudiés dans la population non LCM



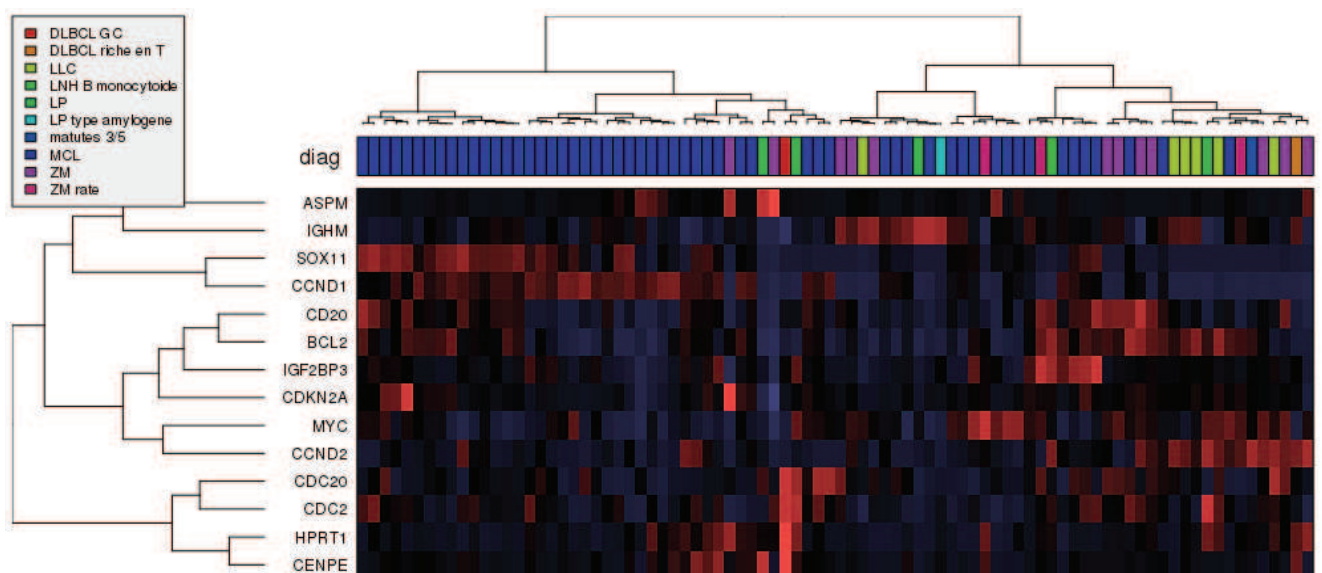
III. VALEUR DIAGNOSTIQUE DU TEST

Afin d'évaluer la valeur diagnostique de notre essai, un *clustering* hiérarchique de l'expression de l'ensemble des gènes choisis, dans l'ensemble des patients a été réalisé.

Il s'agit d'un *clustering* basé uniquement sur les valeurs d'expression ("non supervisé").

Ce *clustering* de l'ensemble des gènes permet de séparer en partie les LCM des autres LNH.

Figure 11 : *Clustering* hiérarchisé de l'ensemble des gènes



La ligne du haut indique le diagnostic histopathologique retenu. Chaque cellule est colorée en fonction de l'expression normalisée du gène, c'est à dire qu'une cellule noire indique que le patient a une expression moyenne (par rapport à la série complète), bleu une expression inférieure à la moyenne et rouge supérieure à la moyenne.

Très peu de LCM avaient une expression relative d'ASPM supérieure à la moyenne contrairement à SOX11 dont l'expression est plus élevée dans les LCM.

L'expression du gène de la cycline D1 était également plus importante dans les LCM contrairement à l'expression du gène de la cycline D2.

L'expression des autres gènes paraît moins corrélée au diagnostic.

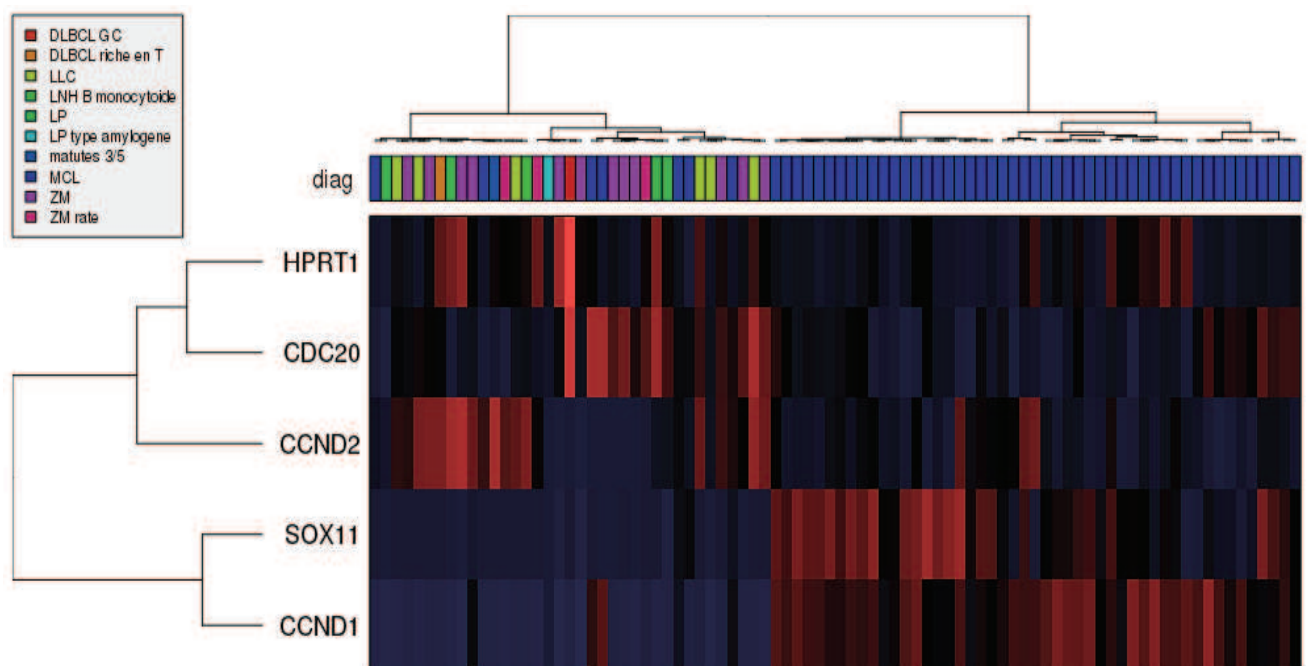
Le *clustering* hiérarchisé de l'ensemble des gènes choisis (figure 11) ne permet pas de séparer les LCM des diagnostics différentiels de manière simple.

De ce fait, nous avons réalisé d'autres *clustering* « simplifiés », comportant un nombre optimal de cible et capable de différencier les 2 groupes histopathologiques.

Tout d'abord, nous avons réalisé un *clustering* uniquement avec les gènes discriminant statistiquement les MCL des autres lymphomes/SLP (figure 12). Pour cela des t-tests entre "LCM" et "non-LCM" pour chaque gène ont été réalisés, et les p-valeurs ont été corrigées pour les tests multiples. Les gènes sélectionnés sont les gènes avec un FDR (*False discovery rate*) inférieur à 10%.

Le tableau 9 précise les p-valeurs et les FDR pour chaque gène, triés par significativité.

Figure 12 : *Clustering* avec les gènes discriminant



La ligne du haut indique le diagnostic. Chaque cellule est colorée en fonction de l'expression normalisée du gène, c'est à dire qu'une cellule noire indique que le patient a une expression moyenne (par rapport à la série complète), bleu une expression inférieure à la moyenne et rouge supérieure à la moyenne.

Tableau 9 : Valeurs statistiques diagnostiques des différents gènes

GENES	t	p.value	FDR
<i>CCND1</i>	-15,64	6,02E-24	8,42E-23
<i>SOX11</i>	-9,55	2,32E-13	1,63E-12
<i>CCND2</i>	3,76	6,31E-04	2,94E-03
<i>HPRT1</i>	2,93	6,21E-03	2,17E-02
<i>CDC20</i>	2,32	2,55E-02	7,13E-02
<i>MYC</i>	1,95	5,60E-02	1,31E-01
<i>IGHM</i>	1,33	1,93E-01	3,40E-01
<i>CDC2</i>	1,32	1,95E-01	3,40E-01
<i>ASPM</i>	1,26	2,18E-01	3,40E-01
<i>BCL2</i>	0,84	4,03E-01	5,29E-01
<i>CENPE</i>	0,82	4,15E-01	5,29E-01
<i>IGF2BP3</i>	-0,27	7,89E-01	9,21E-01
<i>CD20</i>	-0,04	9,65E-01	9,93E-01
<i>CDKN2A</i>	0,01	9,93E-01	9,93E-01

Comme nous pouvons le voir dans le tableau 9, les 5 gènes avec des valeurs statistiques significatives, correspondant aux gènes les plus discriminants sur le plan diagnostique, étaient *CCND1*, *SOX11*, *CCND2*, *HPRT1* et *CDC20*.

En réalisant un *clustering* avec ces 5 gènes seuls 7 (12%) LCM n'étaient pas classés correctement dans le groupe LCM.

7 de ces LCM avaient une expression de *SOX11* inférieure à la moyenne, et 5 une expression du gène de la cycline D1 inférieure ou au niveau de la moyenne d'expression.

Parmi ces 7 LCM, les 2 les plus à gauche du *clustering* correspondaient aux 2 patients avec une faible expression de la cycline D1 et une expression relative de *SOX11* < 0,1 et surtout sans $t(11;14)$, donc probablement des erreurs diagnostiques.

Les valeurs statistiques de l'expression de *CCND1*, *SOX11* et *CCND2* étaient nettes avec des valeurs de $p < 0,05$.

Comme nous pouvons également le voir sous une autre forme de présentation (figure 13) (box plot qui permet de voir la médiane, l'expression génique relative maximale et minimale pour chaque gène), la différence d'expression relative du gène de la cycline D1 était statistiquement significative entre les deux groupes, de même pour les 4 autres gènes représentés (Mann Whitney test).

Du fait de la significativité importante de l'expression de ces 3 gènes nous avons encore simplifié le *clustering* en utilisant uniquement ces 3 gènes.

Figure 13 : Box plot représentant l'expression génique relative des gènes *CCND1*, *CCND2*, *SOX11*, *HPRT1*, *CDC20* en comparant les LCM aux non LCM

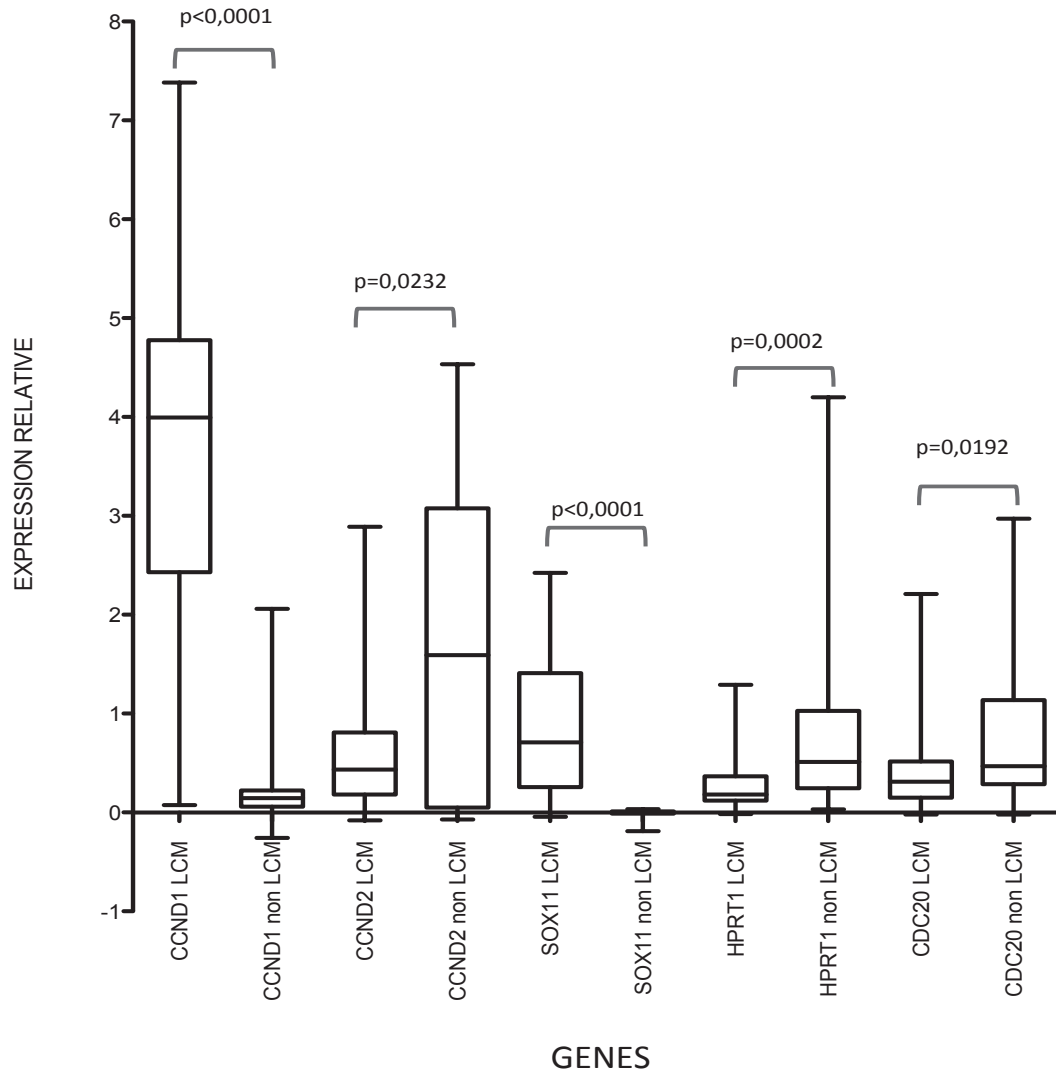
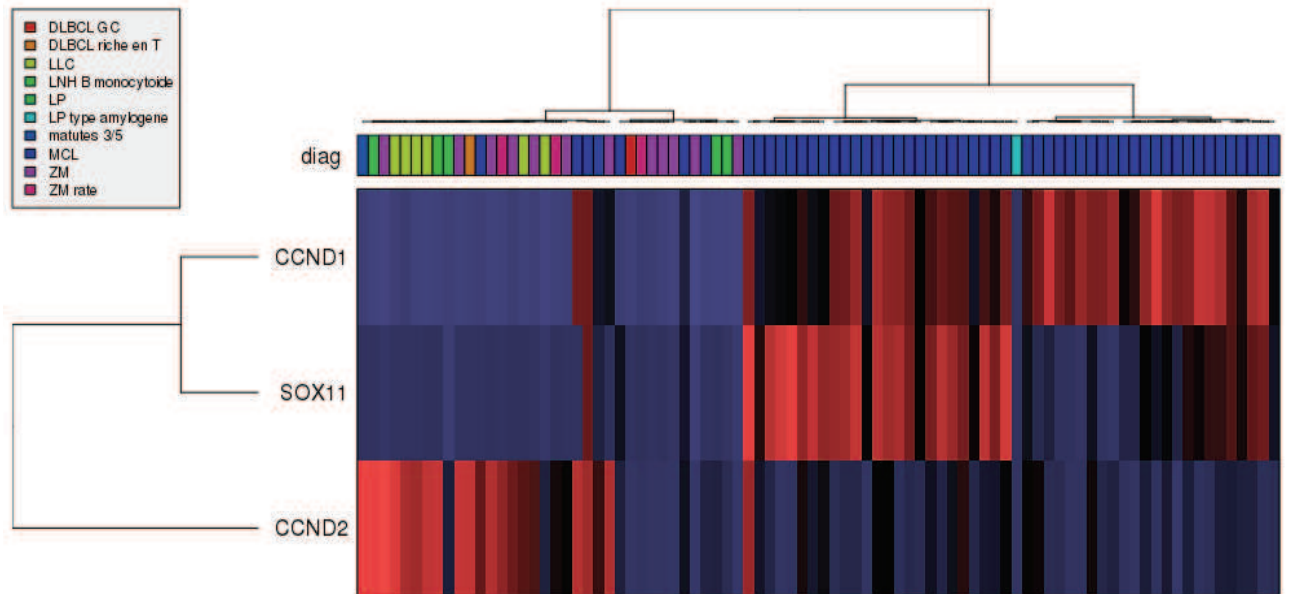


Figure 14 : *Clustering* hiérarchisant SOX11, CCND1 et CCND2



La ligne du haut indique le diagnostic. Chaque cellule est colorée en fonction de l'expression normalisée du gène, c'est à dire qu'une cellule noire indique que le patient a une expression moyenne (par rapport à la série complète), bleu une expression inférieure à la moyenne et rouge supérieure à la moyenne.

En utilisant uniquement ces 3 gènes, la population LCM a bien été séparée des autres LNH/SLP.

Les 2 patients avec un doute diagnostique étaient encore séparés de la population LCM.

Comme cela a déjà été décrit dans la littérature, l'expression relative de SOX11 était inférieure dans les lymphomes non LCM.

IV. VALEUR PRONOSTIQUE DU TEST

1. Analyse statistique selon le modèle de Cox

La médiane de survie globale par rapport à la date diagnostique dans notre série de 56 patients ayant un LCM était de 4,75 ans.

En utilisant l'ensemble des données collectées et en les analysant selon un modèle de Cox univarié, les facteurs pronostiques retrouvés étaient : le fait d'avoir été autogreffé ($p=0,0415$), l'hyperlymphocytose $>10G/L$ ($p=0,0498$), le score MIPI ($p=0,0115$), le traitement par rituximab ($p=0,0144$) ainsi que la splénomégalie ($p=0,0115$).

L'impact pronostique de l'expression relative des gènes étudiés a été testé selon l'expression positive ou négative ($<0,1$ pic visible) ainsi que l'expression par rapport à la médiane.

Lorsque le test statistique a été utilisé avec la positivité ou non de l'expression du gène en RT-MLPA les gènes pronostiques en univarié étaient *CD20* ($p=0,0278$), *HPRT1* ($p=0,0069$) et *IGHM* ($p=0,0399$).

En analyse multivariée, les variables statistiquement significatives étaient :

- la présence d'une splénomégalie ($p=0,0128$)
- le traitement par rituximab ($p=0,0005$)
- Le score MIPI ($p=0,0111$)
- L'expression de *HPRT1* ($p=0,0073$)
- L'expression de *CD20* ($p=0,0235$)

Lorsque la médiane d'expression sert de référence pour la positivité ou non du gène en RT-MLPA : le seul gène ayant une valeur pronostique statistique en univarié était *IGHM* ($p=0,0451$).

En analyse multivariée les variables statistiquement significatives étaient :

-la présence d'une splénomégalie (p=0,0211)

-le traitement par rituximab (p=0,0085)

-Le score MIPI (p=0,0026)

-L'expression de *IGHM* (p=0,0172)

Tableau 10 : Résultats selon le modèle de Cox dans l'ensemble de notre population (n=56)

Variabiles	p	HR	IC 95%
Analyse univariée			
Autogreffe	0,0415	0,4882	0,2417-0,9861
Lymphocytes>10G/L	0,0498	2,7196	1,1071-6,6810
MIPI	0,0115	1,7101	1,1051-2,6461
Rituximab	0,0144	0,3301	0,1487-0,7328
Splénomégalie	0,0115	2,5284	1,2722-5,0252
<i>Seuil expression génique relative : 0,1</i>			
CD20	0,0278	0,3596	0,1550-0,8339
HPRT1	0,0069	3,3150	1,2521-8,7768
IGHM	0,0399	0,4797	0,2331-0,9870
<i>Seuil expression génique relative: médiane</i>			
IGHM	0,0451	0,5008	0,2520-0,9951
Analyse multivariée (seuil expression génique : 0,1)			
Splénomégalie	0,0128	2,7766	1,2480-6,1774
Rituximab	0,0005	0,1677	0,0619-0,4542
MIPI	0,0111	1,9885	1,1731-3,3706
HPRT1	0,0073	4,9607	1,5498-15,8790
CD20	0,0235	0,3239	0,1227-0,8549
Analyse multivariée (seuil expression génique : médiane)			
Splénomégalie	0,0211	2,4886	1,1510-5,3807
Rituximab	0,0085	0,3000	0,1229-0,7321
MIPI	0,0026	2,2967	1,3402-3,9358
IGHM	0,0172	0,3618	0,1573-0,8318

Du fait de l'hétérogénéité des prélèvements, l'analyse d'un sous-groupe ayant eu la biopsie au diagnostic comprenant 40 patients a été analysé selon les mêmes méthodes.

Aucun gène n'était significatif lorsque l'expression relative était séparée en positive et négative.

Les variables statistiquement significatives étaient en univarié :

-Le fait d'avoir été autogreffé (p=0,0125)

-Le traitement par rituximab (p=0,0010)

-La splénomégalie (p=0,0432)

En multivarié seul l'utilisation du rituximab était statistiquement significatif (p=0,0007)

En utilisant la médiane de l'expression génique comme seuil de positivité l'expression de *ASPM* (p= 0,0331) et d'*IGHM* (p=0,0414) étaient significatives en univarié.

En multivarié l'expression génique de ces 2 gènes (*IGHM* p=0,0249, *ASPM* p=0,0052) restait significative ainsi que le traitement par rituximab (p=0,0002).

Tableau 11 : Résultats selon le modèle de Cox pour les patients ayant eu la biopsie au diagnostic (n=40)

Variables	p	HR	IC 95%
Analyse univariée			
Autogreffe	0,0125	0,3358	0,1422-0,7931
Rituximab	0,0010	0,1553	0,0554-0,4351
Splénomégalie	0,0432	2,4222	1,0350-5,6687
<i>Seuil expression génique relative : 0,1</i> aucun gène			
<i>Seuil expression génique relative : médiane</i>			
ASPM	0,0331	2,7176	1,0818-6,8268
IGHM	0,0414	0,4109	0,1719 -0,9822
Analyse multivariée (seuil expression génique : 0,1)			
Rituximab	0,0007	0,1688	0,0603-0,4724
Analyse multivariée (seuil expression génique : médiane)			
Rituximab	0,0002	0,1181	0,0384-0,3633
ASPM	0,0052	4,6829	1,5931-13,7649
IGHM	0,0249	0,3216	0,1200-0,8620

Du fait de l'impact fort du traitement par rituximab, une analyse du sous-groupe des patients traités par rituximab a également été réalisée.

Dans l'ensemble des patients traités par rituximab (n=45), en utilisant 0,1 comme seuil de positivité pour l'expression génique relative, HPRT1 (p= 0,0086) et CD20 (p=0,0047) restaient significatifs en univarié, ainsi que le MIPI (p=0,0059) et les lymphocytes>10G/L (p=0,0189).

En multivarié seuls CD20 (p=0,0142) et le MIPI (p=0,0197) restaient significatifs.

Lorsque la médiane des échantillons était utilisée comme seuil aucun gène n'avait de valeur statistique. En multivarié seul le score MIPI (p=0,0059) était statistiquement significatif.

Tableau 12 : Résultats selon le modèle de Cox dans l'ensemble des patients traités par rituximab (n=45)

Variabiles	p	HR	IC 95%
Analyse univariée			
Lymphocytes>10G/L	0,0189	1,4547-10,7261	1,4547-10,7261
MIPI	0,0059	1,9560	1,1746-3,2573
<i>Seuil expression génique relative : 0,1</i>			
HPRT1	0,0086	4,0655	1,2007-13,7656
CD20	0,0047	0,2387	0,0950-0,6000
<i>Seuil expression génique relative : médiane aucun gène</i>			
Analyse multivariée (seuil expression génique : 0,1)			
MIPI	0,0197	1,8301	1,1039-3,0339
CD20	0,0142	0,3058	0,1191-0,7848
Analyse multivariée (seuil expression génique : médiane)			
MIPI	0,0059	1,9560	1,1746-3,2573

Enfin lorsque le sous-groupe de patients ayant eu la biopsie au diagnostic et ayant été traité par rituximab (n=30) a été analysé en utilisant le seuil de positivité de 0,1 pour l'expression génique en RT-MLPA seuls l'expression de *CD20* (p=0,0634) et l'hyperlymphocytose (p=0,0445) étaient significatifs en univarié comme en analyse multivarié.

Lorsque la médiane a été utilisée comme seuil de positivité pour l'expression génique, l'expression génique d'*ASPM* (p=0,0223) était significative en univariée comme l'hyperlymphocytose mais l'expression d'*ASPM* n'était plus significative en analyse multivariée.

Tableau 13 : Résultats selon le modèle de Cox dans l'ensemble des patients ayant eu la biopsie au diagnostic et traités par rituximab (n=30)

Variables	p	HR	IC 95%
Analyse univariée			
Lymphocytes>10G/L	0,0445	4,8213	1,2764-18,2117
<i>Seuil expression génique : 0,1</i>			
CD20	0,0634	0,2146	0,0477-0,9649
<i>Seuil expression génique : médiane</i>			
ASPM	0,0223	3,9596	1,1664-13,4420
Analyse multivariée (seuil expression génique : 0,1)			
Lymphocytes>10G/L	0,0100	6,4005	1,5708-26,0798
CD20	0,0252	0,1676	0,0354-0,7947
Analyse multivariée (seuil expression génique : médiane)			
Lymphocytes>10G/L	0,0445	4,8213	1,2764-18,2117

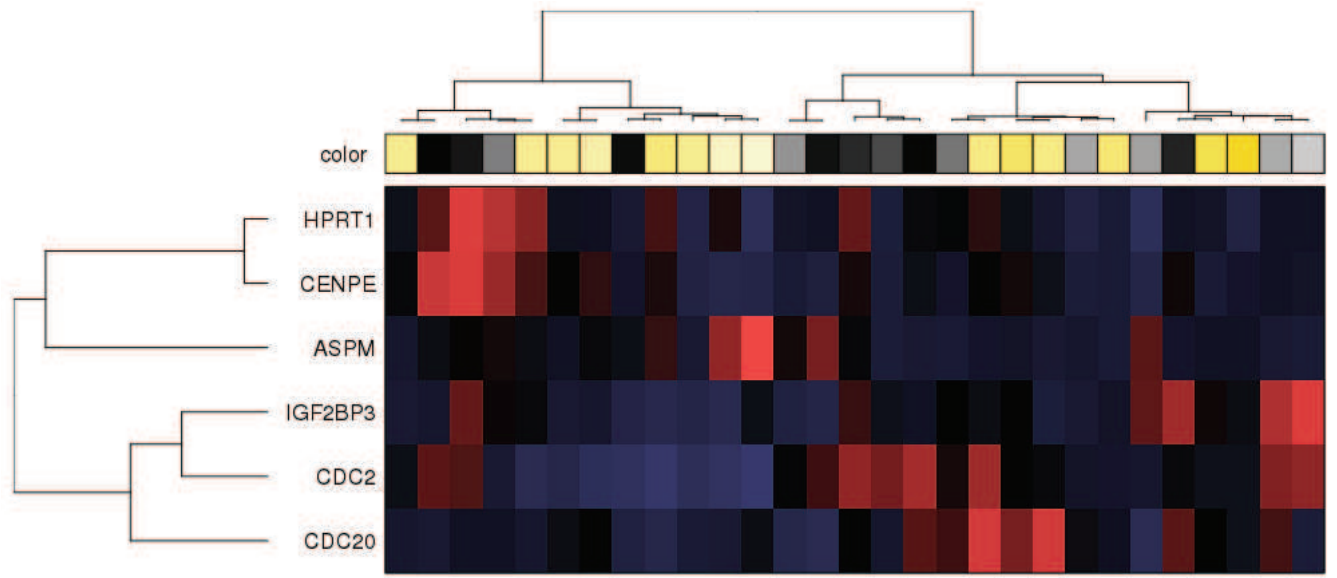
2. Clustering hiérarchique

Notre population étant très hétérogène en terme de traitement, de délai entre le diagnostic et la date de la biopsie analysée, nous avons réalisé un *clustering* hiérarchique pour la population homogène ayant reçu du rituximab et dont l'ARN analysé a été obtenu au diagnostic initial (n=30).

Du fait également des résultats statistiques variables obtenus par la modèle de Cox, nous nous sommes également focalisés sur les gènes pronostiques dans la littérature (106).

Idéalement, les patients devraient être séparés en 2 groupes (un noir, un jaune). Cependant même dans ce sous-groupe relativement homogène, aucune sous population n'a pu se démarquer.

Figure 14 : *Clustering* hiérarchique de la survie globale en fonction de l'expression des différents gènes étudiés



Les patients en vie sont illustrés par la couleur jaune, les patients décédés en noir, avec une teinte selon le suivi. Un patient mort très rapidement est en gris très foncé, et un patient resté longtemps en vie est en jaune très foncé.

DISCUSSION

Les LCM sont des lymphomes pouvant revêtir différentes présentations cliniques, pouvant aller d'une forme indolente à une forme très agressive rapidement évolutive.

Depuis l'utilisation de la cycline D1 en immunohistochimie, la recherche d'une hyper-expression de la cycline D1 en biologie moléculaire, et la recherche de $t(11;14)(q13;q32)$ en cytogénétique, le diagnostic de ce lymphome est plus accessible et nettement plus reproductible.

Cependant ces techniques, relativement longues et coûteuses, ne sont pas réalisées dans tous les laboratoires, et peuvent être en défaut dans les rares cas de lymphomes cellules du manteau dépourvus de translocation $t(11;14)$ (36).

Compte tenu de la présentation variable tant clinique qu'anatomopathologique (formes à petites cellules, variante blastoïde...), le diagnostic de LCM reste un diagnostic difficile en l'absence de l'ensemble des critères diagnostiques.

Notre travail avait pour but d'établir un test simple, rapide (<48h), peu coûteux, pouvant séparer les LCM de ses principaux diagnostics différentiels de manière fiable.

La technique de RT-MLPA remplit la plupart de ces critères, cependant une des limites de cette technique est la nécessité d'obtenir des ARN de bonne qualité, nous devons également évaluer cette technique sur de l'ARN extrait de paraffine.

A visée diagnostique, l'utilisation de seulement 3 gènes semble suffisante (*CCND1*, *CCND2*, *SOX11*) dans notre série.

En effet, un *clustering* basé sur ces trois gènes permet de séparer la population LCM des diagnostics différentiels (88% des LCM sont bien classés).

Notre travail confirme l'intérêt diagnostique de *SOX11* (29), étant donné sa constante négativité dans les hémopathies B de bas grade non LCM.

Les LCM cyclines D1 négatifs sont classiquement *SOX11* positifs et ont une hyper-expression de la cycline D2 (29, 36). Ces modifications pourraient perturber le *clustering* et mal classer ces LCM cycline D1 négatifs.

Dans notre série nous n'avons qu'un « réel » LCM sans hyper-expression du gène la cycline D1 négatif, ce LCM est en effet mal classé dans notre *clustering* basé sur les trois gènes discriminants.

De la même manière il existe des LCM SOX11 négatifs (110) et des LCM SOX11/Cycline D1 négatifs.

Nos deux patients CyclineD1 et SOX11 négatifs pourraient appartenir à ce groupe de patient et ne sont pas intégrés au groupe LCM sur le *clustering* basé sur l'expression des gènes discriminants.

Cependant ces entités restent rarissimes et la concertation entre l'anatomopathologiste le clinicien et le cytogénéticien est indispensable afin de poser le diagnostic de LCM.

Un anticorps spécifique de SOX11 a été développé en immunohistochimie (126), la corrélation de notre test d'expression génique avec la positivité ou non en immunohistochimie serait intéressante.

En effet certains des LCM et des hémopathies B non LCM analysés ont une expression génique faible voire négative de *CD20*, cependant l'ensemble des biopsies étudiées étaient *CD20* positives en immunohistochimie.

Ce résultat lève un doute sur la corrélation entre l'expression génique et les données immunohistochimiques.

L'autre objectif de notre travail était d'évaluer la valeur pronostique de notre test.

Le test élaboré n'a pas permis de prouver de manière statistique la valeur pronostique de l'expression relative des gènes choisis contrairement à certaines données de la littérature (105, 106, 110).

Ces résultats peuvent être expliqués en partie par l'hétérogénéité et le faible effectif de notre population analysée.

Nos patients étaient âgés de 37 à 85 ans au moment du diagnostic ce qui entraîne une différence importance de prise en charge thérapeutique.

Du fait de certains diagnostics antérieurs aux années 2000 certains patients n'ont pu bénéficier du rituximab, tout comme l'utilisation d'aracytine qui s'est avérée être une des drogues majeure dans cette pathologie.

Au total notre étude concerne une population relativement homogène de seulement 30 patients dans laquelle seul le MIPI constitue un facteur pronostique clairement identifié. Dans le modèle de *Blenk et al* (106), modèle sur lequel nous nous sommes principalement basés pour le choix des gènes à tester, le gène *BIRC5* (*baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5* : inhibiteur apoptotique) était une partie non négligeable de ce modèle, cependant la technique de RT-MLPA n'a pas fonctionné pour ce gène sur notre série de mise au point, d'autre part les auteurs ont utilisé un modèle avec des coefficients, qui donne donc un poids différent à chaque gène, ce qui n'est pas le cas dans notre essai.

Dans notre série, quelle que soit la méthode utilisée l'expression de SOX 11 ne s'associe pas au pronostic. Sur nos 6 patients « SOX11 négatif » un seul se présentait sous une forme indolente au diagnostic, les 5 autres se présentaient sous une forme agressive et n'ont pas une survie plus longue, résultats en contradiction avec les données de la littérature (127).

CONCLUSION- PERSPECTIVES

Notre travail a donc permis de valider la technique de RT-MLPA avec les gènes choisis ainsi que la valeur diagnostique de l'expression génique relative du gène de la cycline D1, cycline D2, *HPRT1*, *CDC20* et particulièrement de *SOX11*.

Notre travail montre qu'en faisant appel à la technique de RT-MPLA limitée à 3 gènes : *CCND1*, *CCND2*, *SOX11*, le diagnostic de LCM peut être porté avec une fiabilité de 88% (Caryotype conventionnel 65%, PCR 20-30%) avec un délai de 48 heures et un coût inférieur à celui des méthodes à ce jour utilisées.

En revanche, l'intérêt pronostique de ce test ne ressort pas dans la population analysée, cependant la poursuite des investigations sur une population plus importante et plus homogène est nécessaire.

Cette technique a également pu être réalisée sur ARN extrait d'échantillons tumoraux conservés en paraffine (FFPE) et permet de faire le diagnostic du sous type moléculaire des lymphomes diffus à grandes cellules (GC/ABC) (*Ruminy et al, ASH dec 2013, Nouvelle Orléans, données non publiées*).

Ce test est également en cours de développement pour obtenir des profils d'expression de microRNA dans les lymphomes.

D'autres techniques permettant d'obtenir un profil d'expression génique ciblé sont actuellement commercialisés ou en cours de développement : technologie Nanostring® RT-QMPSF, microarrays dédiés notamment.

Le coût très faible, la rapidité et la flexibilité de la RT-MPLA constituent des caractéristiques très avantageuses par rapport à ces autres techniques.

Nos travaux sont préliminaires et doivent être complétés par des analyses complémentaires avant une diffusion plus large dans les laboratoires de biologie moléculaire. Ils seront complétés en particulier par une évaluation de la reproductibilité, une optimisation des conditions expérimentales pour les ARN dégradés, une étude de nouveaux sets de gènes à visée pronostique en fonction du type histologique du lymphome et des données de la littérature, une augmentation des capacités de multiplexage et une optimisation de l'analyse bioinformatique.

ANNEXES

ANNEXE 1 : La technique de RT-MLPA

1 Réaction de transcriptase inverse



2 Dénaturation et hybridation



3 Ligation

Avec endonucléase sensible à la méthylation



4 PCR avec amorces universelles X et Y



5 Analyse des fragments



RT-MLPA

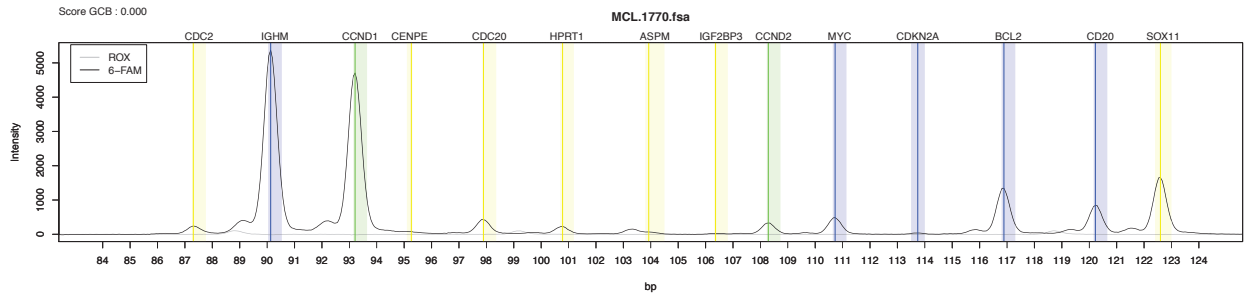
Chaque sonde est constituée initialement d'une paire d'oligonucléotide qui ne peuvent être joints l'un à l'autre qu'après s'être hybridé à leur séquence cible .

Chaque oligonucléotide comporte une séquence complémentaire d'un jeu d'amorces communes et une séquence spécifique du site à tester, située à l'extrémité 3' d'un des oligonucléotides de la paire et à l'extrémité 5' de l'autre.

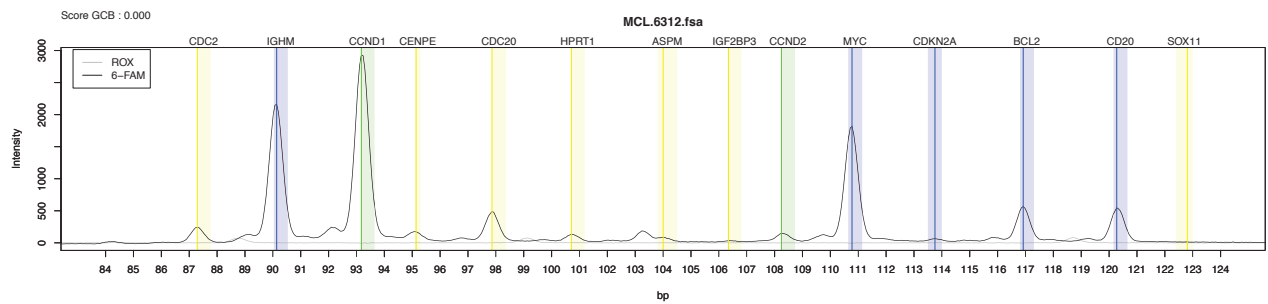
Après l'étape de ligation, les sondes sont amplifiées par PCR avec le couple d'amorces communes. Seules les sondes formées d'une paire d'oligonucléotides réunis par la ligase peuvent être amplifiées. L'une des amorces porte un fluorochrome. Le produit de PCR est analysé sur un séquenceur. Le produit d'amplification de chaque paire d'oligonucléotides a une longueur définie donnant un pic unique sur le tracé du séquenceur.

ANNEXE 2 : Profil d'expression génique en RT-MLPA

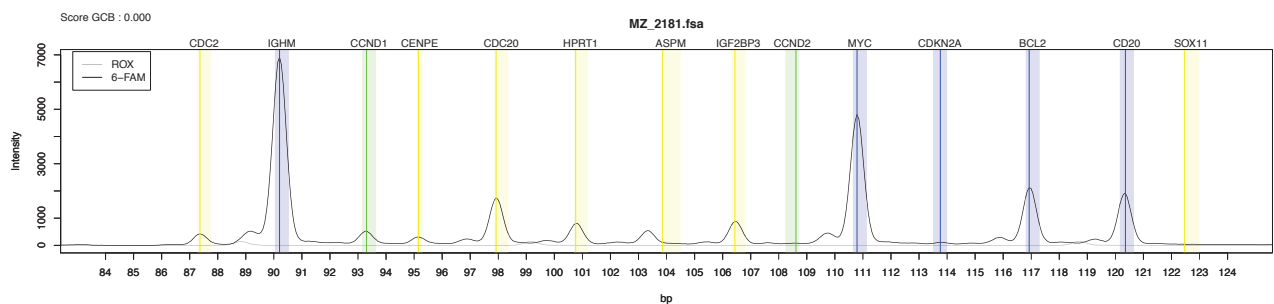
A LCM typique SOX11+



B LCM atypique SOX11-



C LZM



BIBLIOGRAPHIE

1. Campo E, *et al.* (2011) The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117(19):5019-5032.
2. Cortelazzo S, Ponzoni M, Ferreri AJ, & Dreyling M (2012) Mantle cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 82(1):78-101.
3. Zhou Y, *et al.* (2008) Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004. *Cancer* 113(4):791-798.
4. Pittaluga S, *et al.* (1998) Blastic variant of mantle cell lymphoma shows a heterogenous pattern of somatic mutations of the rearranged immunoglobulin heavy chain variable genes. *British journal of haematology* 102(5):1301-1306.
5. Du MQ, *et al.* (1997) Ongoing immunoglobulin gene mutations in mantle cell lymphomas. *British journal of haematology* 96(1):124-131.
6. Schollkopf C, *et al.* (2008) Borrelia infection and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 111(12):5524-5529.
7. Zahm SH, *et al.* (1990) A case-control study of non-Hodgkin's lymphoma and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in eastern Nebraska. *Epidemiology* 1(5):349-356.
8. Tort F, *et al.* (2004) Familial lymphoid neoplasms in patients with mantle cell lymphoma. *Haematologica* 89(3):314-319.
9. Jares P & Campo E (2008) Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *British journal of haematology* 142(2):149-165.
10. Ferrer A, *et al.* (2007) Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. *Cancer* 109(12):2473-2480.
11. Montserrat E, *et al.* (1996) CNS involvement in mantle-cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 14(3):941-944.
12. Barista I, Romaguera JE, & Cabanillas F (2001) Mantle-cell lymphoma. *The Lancet Oncology* 2(3):141-148.
13. Bosch F, *et al.* (1998) Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 82(3):567-575.
14. Orchard J, *et al.* (2003) A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood* 101(12):4975-4981.
15. Salaverria I, Perez-Galan P, Colomer D, & Campo E (2006) Mantle cell lymphoma: from pathology and molecular pathogenesis to new therapeutic perspectives. *Haematologica* 91(1):11-16.
16. Duggan MJ, *et al.* (1990) Mantle zone lymphoma. A clinicopathologic study of 22 cases. *Cancer* 66(3):522-529.
17. Swerdlow SH, *et al.* (1983) Centrocytic lymphoma: a distinct clinicopathologic and immunologic entity. A multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse. *The American journal of pathology* 113(2):181-197.
18. Weisenburger DD, Kim H, & Rappaport H (1982) Mantle-zone lymphoma: a follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma. *Cancer* 49(7):1429-1438.

19. Aqel N, Barker F, Patel K, & Naresh KN (2008) In-situ mantle cell lymphoma--a report of two cases. *Histopathology* 52(2):256-260.
20. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, & Gascoyne RD (1997) Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 89(6):2067-2078.
21. Ott MM, *et al.* (1994) The anaplastic variant of centrocytic lymphoma is marked by frequent rearrangements of the bcl-1 gene and high proliferation indices. *Histopathology* 24(4):329-334.
22. Zukerberg LR, Medeiros LJ, Ferry JA, & Harris NL (1993) Diffuse low-grade B-cell lymphomas. Four clinically distinct subtypes defined by a combination of morphologic and immunophenotypic features. *American journal of clinical pathology* 100(4):373-385.
23. Arber DA, Rappaport H, & Weiss LM (1997) Non-Hodgkin's lymphoproliferative disorders involving the spleen. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 10(1):18-32.
24. Hollema H, Visser L, & Poppema S (1991) Small lymphocytic lymphomas with predominant splenomegaly: a comparison of immunophenotypes with cases of predominant lymphadenopathy. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 4(6):712-717.
25. Tiemann M, *et al.* (2005) Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *British journal of haematology* 131(1):29-38.
26. Gao J, Peterson L, Nelson B, Goolsby C, & Chen YH (2009) Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *American journal of clinical pathology* 132(5):699-706.
27. Gualco G, Weiss LM, Harrington WJ, Jr., & Bacchi CE (2010) BCL6, MUM1, and CD10 expression in mantle cell lymphoma. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 18(2):103-108.
28. Dictor M, *et al.* (2009) Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 94(11):1563-1568.
29. Mozos A, *et al.* (2009) SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 94(11):1555-1562.
30. Yatabe Y, *et al.* (2000) Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* 95(7):2253-2261.
31. Espinet B, *et al.* (2010) Incidence and prognostic impact of secondary cytogenetic aberrations in a series of 145 patients with mantle cell lymphoma. *Genes, chromosomes & cancer* 49(5):439-451.
32. Bertoni F & Ponzoni M (2007) The cellular origin of mantle cell lymphoma. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(10):1747-1753.
33. Ondrejka SL, Lai R, Smith SD, & Hsi ED (2011) Indolent mantle cell leukemia: a clinicopathological variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica* 96(8):1121-1127.

34. Fernandez V, *et al.* (2010) Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer research* 70(4):1408-1418.
35. Gustavsson E, *et al.* (2010) SOX11 expression correlates to promoter methylation and regulates tumor growth in hematopoietic malignancies. *Molecular cancer* 9:187.
36. Wlodarska I, *et al.* (2008) Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood* 111(12):5683-5690.
37. Abboudi Z, Patel K, & Naresh KN (2009) Cyclin D1 expression in typical chronic lymphocytic leukaemia. *European journal of haematology* 83(3):203-207.
38. Sola B, Salaun V, Ballet JJ, & Troussard X (1999) Transcriptional and post-transcriptional mechanisms induce cyclin-D1 over-expression in B-chronic lymphoproliferative disorders. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 83(2):230-234.
39. Avet-Loiseau H, *et al.* (1998) Detection of t(11;14) using interphase molecular cytogenetics in mantle cell lymphoma and atypical chronic lymphocytic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer* 23(2):175-182.
40. Jares P, Colomer D, & Campo E (2007) Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nature reviews. Cancer* 7(10):750-762.
41. Dono M, Cerruti G, & Zupo S (2004) The CD5+ B-cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36(11):2105-2111.
42. Welzel N, *et al.* (2001) Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer research* 61(4):1629-1636.
43. Kienle D, *et al.* (2003) VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* 102(8):3003-3009.
44. Camacho FI, *et al.* (2003) Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood* 101(10):4042-4046.
45. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, & Stevenson FK (1999) Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94(6):1848-1854.
46. Lai R, *et al.* (2006) Immunoglobulin VH somatic hypermutation in mantle cell lymphoma: mutated genotype correlates with better clinical outcome. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 19(11):1498-1505.
47. Walsh SH, *et al.* (2003) Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood* 101(10):4047-4054.
48. Navarro A, *et al.* (2012) Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer research* 72(20):5307-5316.
49. Schraders M, *et al.* (2009) Hypermutation in mantle cell lymphoma does not indicate a clinical or biological subentity. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 22(3):416-425.
50. Jares P, Colomer D, & Campo E (2012) Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *The Journal of clinical investigation* 122(10):3416-3423.

51. Medeiros LJ, Van Krieken JH, Jaffe ES, & Raffeld M (1990) Association of bcl-1 rearrangements with lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation. *Blood* 76(10):2086-2090.
52. Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science* 274(5293):1672-1677.
53. Hunter T & Pines J (1994) Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79(4):573-582.
54. Obrador-Hevia A, Fernandez de Mattos S, Villalonga P, & Rodriguez J (2009) Molecular biology of mantle cell lymphoma: from profiling studies to new therapeutic strategies. *Blood reviews* 23(5):205-216.
55. Hernandez L, *et al.* (2005) CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer research* 65(6):2199-2206.
56. Dreyling MH, *et al.* (1997) Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer research* 57(20):4608-4614.
57. Serrano M, Hannon GJ, & Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366(6456):704-707.
58. Bea S, *et al.* (2001) BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer research* 61(6):2409-2412.
59. Fernandez V, Hartmann E, Ott G, Campo E, & Rosenwald A (2005) Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(26):6364-6369.
60. Halldorsdottir AM, *et al.* (2011) Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 25(12):1904-1908.
61. Gelebart P, *et al.* (2008) Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. *Blood* 112(13):5171-5179.
62. Bjornsti MA & Houghton PJ (2004) The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 4(5):335-348.
63. Camacho E (2002) ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 99(1):238-244.
64. Schaffner C, Idler I, Stilgenbauer S, Dohner H, & Lichter P (2000) Mantle cell lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(6):2773-2778.
65. Fang NY, *et al.* (2003) Oligonucleotide microarrays demonstrate the highest frequency of ATM mutations in the mantle cell subtype of lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9):5372-5377.
66. Tort F, *et al.* (2005) Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms. *Leukemia* 19(1):112-117.
67. Hangaishi A, *et al.* (2002) Mutations of Chk2 in primary hematopoietic neoplasms. *Blood* 99(8):3075-3077.
68. Tort F, *et al.* (2002) CHK2-decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 100(13):4602-4608.

69. Hofmann WK (2001) Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood* 98(3):787-794.
70. Kridel R, *et al.* (2012) Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood* 119(9):1963-1971.
71. Fabbri G, *et al.* (2011) Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *The Journal of experimental medicine* 208(7):1389-1401.
72. Cinar M, *et al.* (2013) Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by Ibrutinib induces apoptosis. *Leukemia research*.
73. Lenz G, *et al.* (2005) Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(9):1984-1992.
74. Schulz H, *et al.* (2007) Immunochemotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 99(9):706-714.
75. Delarue R, *et al.* (2013) CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 121(1):48-53.
76. Dreyling M, *et al.* (2005) Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood* 105(7):2677-2684.
77. Geisler CH, *et al.* (2012) Nordic MCL2 trial update: six-year follow-up after intensive immunochemotherapy for untreated mantle cell lymphoma followed by BEAM or BEAC + autologous stem-cell support: still very long survival but late relapses do occur. *British journal of haematology* 158(3):355-362.
78. Peterlin P, *et al.* (2012) Is ASCT with TBI superior to ASCT without TBI in mantle cell lymphoma patients? *Transplantation* 94(3):295-301.
79. Dreyling M, *et al.* (2013) Update on the molecular pathogenesis and clinical treatment of mantle cell lymphoma: report of the 11th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Leukemia & lymphoma* 54(4):699-707.
80. Ganti AK, *et al.* (2005) Hematopoietic stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 16(4):618-624.
81. Ahmadi T, *et al.* (2012) Potential prolongation of PFS in mantle cell lymphoma after R-HyperCVAD: auto-SCT consolidation or rituximab maintenance. *Bone marrow transplantation* 47(8):1082-1086.
82. Kluin-Nelemans HC & Doorduijn JK (2011) Treatment of elderly patients with mantle cell lymphoma. *Seminars in hematology* 48(3):208-213.

83. Bauwens D, *et al.* (2005) Activity and safety of combined rituximab with chlorambucil in patients with mantle cell lymphoma. *British journal of haematology* 131(3):338-340.
84. Ghielmini M & Zucca E (2009) How I treat mantle cell lymphoma. *Blood* 114(8):1469-1476.
85. Ghielmini M, *et al.* (2005) Effect of single-agent rituximab given at the standard schedule or as prolonged treatment in patients with mantle cell lymphoma: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(4):705-711.
86. Perez-Galan P, Dreyling M, & Wiestner A (2011) Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 117(1):26-38.
87. Ansell SM, *et al.* (2008) Low-dose, single-agent temsirolimus for relapsed mantle cell lymphoma: a phase 2 trial in the North Central Cancer Treatment Group. *Cancer* 113(3):508-514.
88. Ansell SM, *et al.* (2011) Temsirolimus and rituximab in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a phase 2 study. *Lancet Oncol* 12(4):361-368.
89. Renner C, *et al.* (2012) A multicenter phase II trial (SAKK 36/06) of single-agent everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Haematologica* 97(7):1085-1091.
90. Goy A, *et al.* (2009) Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 20(3):520-525.
91. Ruan J, *et al.* (2011) Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29(6):690-697.
92. Weigert O, *et al.* (2009) A novel regimen combining high dose cytarabine and bortezomib has activity in multiply relapsed and refractory mantle cell lymphoma - long-term results of a multicenter observation study. *Leukemia & lymphoma* 50(5):716-722.
93. Witzig TE, *et al.* (2011) An international phase II trial of single-agent lenalidomide for relapsed or refractory aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 22(7):1622-1627.
94. Wang ML, *et al.* (2013) Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* 369(6):507-516.
95. Lenz G, Dreyling M, & Hiddemann W (2004) Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions. *Annals of hematology* 83(2):71-77.
96. Salaverria I, *et al.* (2007) Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25(10):1216-1222.
97. Letestu R, *et al.* (2004) Prognostic impact of p27KIP1 expression in cyclin D1 positive lymphoproliferative disorders. *Leukemia* 18(5):953-961.

98. Determann O, *et al.* (2008) Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 111(4):2385-2387.
99. Rubio-Moscardo F, *et al.* (2005) Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 105(11):4445-4454.
100. Cuneo A, *et al.* (1999) Cytogenetic profile of lymphoma of follicle mantle lineage: correlation with clinicobiologic features. *Blood* 93(4):1372-1380.
101. Sander S, *et al.* (2008) Genomic aberrations in mantle cell lymphoma detected by interphase fluorescence in situ hybridization. Incidence and clinicopathological correlations. *Haematologica* 93(5):680-687.
102. Jardin F, *et al.* (2009) Detection of gene copy number aberrations in mantle cell lymphoma by a single quantitative multiplex PCR assay: clinicopathological relevance and prognosis value. *British journal of haematology* 146(6):607-618.
103. Solal-Celigny P, *et al.* (2004) Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 104(5):1258-1265.
104. Hoster E, *et al.* (2008) A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 111(2):558-565.
105. Rosenwald A, *et al.* (2003) The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer cell* 3(2):185-197.
106. Blenk S, *et al.* (2008) Explorative data analysis of MCL reveals gene expression networks implicated in survival and prognosis supported by explorative CGH analysis. *BMC cancer* 8:106.
107. Wang YY, *et al.* (2012) [Expression of SOX11 mRNA in mantle cell lymphoma and its clinical significance]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi* 33(7):556-560.
108. Nygren L, *et al.* (2012) Prognostic role of SOX11 in a population-based cohort of mantle cell lymphoma. *Blood* 119(18):4215-4223.
109. Royo C, *et al.* (2012) Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease. *Leukemia* 26(8):1895-1898.
110. Meggendorfer M, Kern W, Haferlach C, Haferlach T, & Schnittger S (2013) SOX11 overexpression is a specific marker for mantle cell lymphoma and correlates with t(11;14) translocation, CCND1 expression and an adverse prognosis. *Leukemia*.
111. Schouten JP, *et al.* (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research* 30(12):e57.
112. Norbury C & Nurse P (1991) Cyclins and cell cycle control. *Current biology : CB* 1(1):23-24.
113. Norbury C & Nurse P (1992) Animal cell cycles and their control. *Annual review of biochemistry* 61:441-470.
114. Sethi N, Monteagudo MC, Koshland D, Hogan E, & Burke DJ (1991) The CDC20 gene product of *Saccharomyces cerevisiae*, a beta-transducin homolog, is required for a subset of microtubule-dependent cellular processes. *Molecular and cellular biology* 11(11):5592-5602.

115. Yen TJ, Li G, Schaar BT, Szilak I, & Cleveland DW (1992) CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis. *Nature* 359(6395):536-539.
116. Choukri M, *et al.* (2013) [Mantle cell lymphoma diagnosis]. *Annales de biologie clinique* 71(1):107-112.
117. Salaverria I, *et al.* (2013) CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* 121(8):1394-1402.
118. Bond J, *et al.* (2002) ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nature genetics* 32(2):316-320.
119. Mueller-Pillasch F, *et al.* (1997) Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene* 14(22):2729-2733.
120. Monk D, *et al.* (2002) Characterisation of the growth regulating gene IMP3, a candidate for Silver-Russell syndrome. *Journal of medical genetics* 39(8):575-581.
121. Nielsen J, *et al.* (1999) A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Molecular and cellular biology* 19(2):1262-1270.
122. Setoodeh R, *et al.* (2013) Double-hit mantle cell lymphoma with MYC gene rearrangement or amplification: a report of four cases and review of the literature. *International journal of clinical and experimental pathology* 6(2):155-167.
123. Vincent-Fabert C, *et al.* (2012) A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and Myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma-like lymphoma formation in mice. *The American journal of pathology* 180(4):1688-1701.
124. Oberley MJ, *et al.* (2013) Immunohistochemical evaluation of MYC expression in mantle cell lymphoma. *Histopathology*.
125. Ferrando AA (2013) SOX11 is a mantle cell lymphoma oncogene. *Blood* 121(12):2169-2170.
126. Nordstrom L, *et al.* (2012) Expanded clinical and experimental use of SOX11 - using a monoclonal antibody. *BMC cancer* 12:269.
127. Lu TX, Li JY, & Xu W (2013) The role of SOX11 in mantle cell lymphoma. *Leukemia research*.

RESUME

Le lymphome à cellules du manteau est caractérisé par la translocation t(11;14)(q11;q32), entraînant une hyperexpression de la cycline D1. Toutefois certains véritables LCM ne présentent pas cette translocation et n'ont donc pas d'hyperexpression de la cycline D1, définissant un sous-type moléculaire distinct.

L'évolution clinique des LCM est hétérogène, le plus souvent agressive et mais aussi, plus rarement, indolente. Les bases moléculaires de cette hétérogénéité clinique reposent en partie sur des profils d'expression génique distincts.

Les objectifs de ce travail étaient d'établir la valeur diagnostique et pronostique d'un profil d'expression génique dans les LCM établi par la technique de RT-MLPA (*Reverse transcriptase-multiplex ligation-dependant probe multiplex amplification*).

56 échantillons d'ARN extrait de biopsies ganglionnaires congelées de LCM pris en charge au centre Henri Becquerel obtenus entre 1991 et 2011 ont été analysés.

Le test se base sur la mesure de l'expression relative d'un panel de gènes comprenant:

- des gènes contrôlant la prolifération et le cycle cellulaire (*CDC2, CDC20, CENPE, HPRT1, CCND1, CCND2, ASPM, IGF2BP3*)
- un proto-oncogène (*MYC*),
- un gène suppresseur de tumeur (*CDKN2A*),
- un gène anti-apoptotique (*BCL2*),
- des gènes spécifiques des cellules B (*CD20, IGHM*)
- le gène SOX11, marqueur diagnostique du LCM, récemment identifié.

Dans ce travail nous démontrons la valeur diagnostique de ce test qui permet de distinguer les LCM des autres lymphomes à petites cellules B en mesurant l'expression des trois gènes les plus discriminants (*CCND1, CCND2, SOX11*). En revanche, nous ne confirmons pas dans cette population hétérogène la valeur pronostique (en terme de survie globale) de l'expression de *MYC*, *BCL2* ou des gènes associés à la prolifération. Compte tenu de la rapidité, de la flexibilité et du faible cout de ce test, nous poursuivons son développement dans d'autres sous-types de lymphomes

Mots clés : Lymphome à cellules du manteau ; biologie moléculaire ; RT-MLPA ; profil d'expression génique