



**HAL**  
open science

**Impact pronostique de la cellule d'origine (COO), de l'expression des protéines BCL2 et MYC et de la mutation MYD88 L265P au diagnostic de Lymphome B Diffus à Grandes Cellules : résultats de l'essai randomisé multicentrique GOELAMS-075**

Gaëlle Laboure

► **To cite this version:**

Gaëlle Laboure. Impact pronostique de la cellule d'origine (COO), de l'expression des protéines BCL2 et MYC et de la mutation MYD88 L265P au diagnostic de Lymphome B Diffus à Grandes Cellules : résultats de l'essai randomisé multicentrique GOELAMS-075. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01246394

**HAL Id: dumas-01246394**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01246394>**

Submitted on 18 Dec 2015

**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.

Université de Bordeaux  
U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2015

N°3172

Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Le 22 octobre 2015

Par Mademoiselle Gaëlle LABOURE  
Née le 21 juin 1985 à Vannes (56)

IMPACT PRONOSTIQUE DE LA CELLULE D'ORIGINE (COO), DE  
L'EXPRESSION DES PROTEINES BCL2 ET MYC ET DE LA  
MUTATION *MYD88* L265P AU DIAGNOSTIC DE LYMPHOME B  
DIFFUS A GRANDES CELLULES : RESULTATS DE L'ESSAI  
RANDOMISE MULTICENTRIQUE GOELAMS-075

Directeurs de thèse

Madame le Docteur Marie-Cécile PARRENS

Monsieur le Professeur Jean-Philippe MERLIO

Jury

Monsieur le Professeur Noel MILPIED

Président

Monsieur le Docteur Jehan DUPUIS

Rapporteur

Madame le Professeur Corinne HAIOUN

Monsieur le Professeur Thierry FEST

Monsieur le Professeur Thierry-Jo MOLINA

# REMERCIEMENTS

## **A Monsieur le Professeur Noël Milpied**

C'est un grand honneur et un immense plaisir d'apprendre à vos côtés. Merci de me faire confiance en m'intégrant dans votre équipe. Soyez assuré de mon entière admiration et de ma gratitude.

## **A Madame le Professeur Corinne Haioun**

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre service où j'ai beaucoup appris et apprécié votre disponibilité et vos sages conseils. En espérant avoir le plaisir de travailler à nouveau avec vous un jour. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Soyez assurée de mon profond respect.

## **A Monsieur le Professeur Thierry Fest**

Pour notre collaboration sur l'essai GOELAMS-075, en espérant la rendre fructueuse. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et d'avoir fait le déplacement. Soyez assuré de mon profond respect.

## **A Monsieur le Professeur Thierry-Jo Molina**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail. Soyez certain de ma reconnaissance.

## **A Monsieur le Docteur Jehan Dupuis**

Un grand merci pour avoir rapporté cette thèse. Ces six mois passés à tes côtés ont été des plus agréables et des plus instructifs. Sois certain de ma profonde sympathie à ton égard.

## **A Madame le Docteur Marie-Cécile Parrens**

Je ne peux exprimer à quel point j'ai apprécié travailler avec toi sur ce projet. Pour ta patience, ta rigueur et ton soutien, je te remercie vivement. J'espère que c'est le début d'une longue collaboration ensemble. Sois assurée de toute ma reconnaissance.

## **A Monsieur le Professeur Jean-Philippe Merlio**

Pour votre enseignement plein de sagesse, pour m'avoir accueillie un an dans votre laboratoire de recherche, pour m'avoir fait confiance sur ce projet, je vous remercie infiniment. Soyez assuré de ma profonde admiration et de mon respect.

### **A Madame le Docteur Marie-Sarah Dilhuydy**

Ma bonne fée. Merci pour ton soutien, tes encouragements, tes conseils. Ravie d'avoir l'opportunité de travailler à tes côtés. Sois certaine de mon amitié et de mon respect.

Aux **Docteur Axelle Lascaux, Docteur Sophie Dimicoli-Salazar, Docteur Stéphane Vigouroux, Docteur Krime Bouabdallah, Docteur Thibaut Leguay, Docteur Reza Tabrizi**, pour participer depuis 6 ans à ma formation dans la joie et la bonne humeur.

Aux **Professeur Arnaud Pigneux et Professeur Gérald Marit**, merci de me faire profiter de votre sagesse et votre savoir. Soyez assurés de ma gratitude.

Au **Docteur Anne Banos**, un grand merci pour ta constante joie de vivre, ta disponibilité, tes qualités humaines.

A mes grands frères et grandes sœurs d'Hématologie : **Docteur Pierre-Yves Dumas, Docteur Edouard Forcade. Docteur Margot Robles, Docteur Catherine Mohr**, merci pour vos conseils avisés, votre réconfort, votre écoute. Plus que des collègues, des amis.

A mes compagnons d'armes : **Claire C., Claire B., Clémence, Delphine, FX, Simon, Baptiste**, ça n'est pas parce que je passe du côté des grands que les choses vont changer ! Merci pour votre bonne humeur constante et d'entretenir cette solidarité qui nous caractérise.

A mes compagnons d'un semestre (ou plusieurs) : **Hélène VQT**, force et honneur, loin des yeux mais jamais loin du cœur ; **Pierre Mélard**, mon compère de hors-filière, c'est peut-être un peu à cause de toi que j'ai autant adoré cette deuxième moitié d'internat ; **Benjamin B.** (Benji Boy !), **Lea, Frantz** (petit chat !), **Emilie G.** (dans la souffrance et la douleur nous vaincrons), **Clémence P., Tuka**, parce que l'anapath avec vous c'était encore plus fort ; **Camille T, Anne L. Olivier M.**, pour ces fous rires au labo d'hémato ; aux colloc' **Bruno, Marie, Benjamin** et **Sophie**, ces 6 mois dans le pays basque n'ont été que du bonheur avec vous ; à **Maxime B, Raphael G.** mes comparses des débuts ; à **Benjamin V., Marie F., Guillaume B., Fabien** et **Elodie**, mes comparses de la fin, merci de m'avoir supportée ces 6 derniers mois.

A l'ensemble des médecins du service d'Hématologie du Pr Haioun, du service d'Anatomopathologie, du laboratoire d'Hématologie, du service de Réanimation Médicale pour avoir participé à mon « éducation » !

A **Laetitia, Edith, Martina, Olivier, Domi, Lamia, Sandrine, David, Liên, Alban, Yamina, Jackie, Joana, Alexandra, Charline, Audrey** pour cette année de Master extraordinaire à vos côtés.

A mon autre bonne fée, **Catherine P.**, pour toujours croire en moi !

A **Magali Bordier** et **Fabian Martinez** pour leur aide précieuse dans ce travail. A l'équipe de techniciens du service d'Anatomopathologie et du service de Biologie Moléculaire des Tumeurs, pour m'avoir permis d'accomplir ce travail.

A La Ligue contre le Cancer Comité Pyrénées-Atlantiques pour avoir permis qu'une partie de ce travail se concrétise.

A **ma mère**, pour cette femme incroyable que tu es, pour tout l'amour et le soutien que tu me donnes.

A **ma sœur**, mon alter ego, pour ce sentiment de fierté et d'amour intense quand je te regarde.

A **Enguerrand**, tu es mon tout, sans toi je ne suis rien.

A **ma famille, mon Parrain** pour leur soutien indéfectible.

A mes beaux-parents **Catherine et Alain**, pour me considérer comme votre propre fille, pour avoir su créer autour de moi un cocon rassurant dans lequel je me sens bien.

A **Yvan et Marie**, notre relation est indescriptible, c'est que de l'amour !

A mes autres « sœurs » : **Sandra, Floriane, Alex, Louise, Emilie, Nono, Mélanie**, vous comptez tellement pour moi...Je ne m'imagine pas une autre vie sans vous.

A la bande des « **copaings** », on a traversé tellement de choses ensemble, et il en reste tellement d'autres encore... Heureuse et fière de vous avoir à mes côtés

A **mon père et Pierrot**,

J'espère vous rendre fiers. Je ne vous oublie pas, vous laissez un vide incommensurable, vous me manquez...

# TABLE DES MATIERES

|  |    |
|--|----|
| REMERCIEMENTS .....  | 2  |
| TABLE DES MATIERES .....   | 5  |
| LISTE DES FIGURES.....   | 7  |
| LISTE DES TABLES.....  | 8  |
| LISTE DES TABLEAUX .....   | 8  |
| LISTE DES ABREVIATIONS .....   | 9  |
| INTRODUCTION .....   | 10 |
| 1.    DONNEES DE SURVIE A L'ERE DU RITUXIMAB : .....                         | 10 |
| 2.    INTENSIFICATION THERAPEUTIQUE EN 1 <sup>ERE</sup> LIGNE : .....        | 11 |
| 3.    FACTEURS PRONOSTIQUES CLINIQUES : .....                                | 12 |
| 4.    CELLULE D'ORIGINE .....  | 14 |
| 4.1.    DETERMINATION DE L'ORIGINE CELLULAIRE DU LYMPHOME : .....            | 14 |
| 4.2.    APPLICATION EN ROUTINE DE LA DETERMINATION DE LA COO PAR IHC : ..... | 16 |
| 5.    CYTOGENETIQUE ET EXPRESSION DES PROTEINES BCL2 ET MYC : .....          | 18 |
| 6.    MUTATIONS SOMATIQUES : .....   | 19 |
| HYPOTHESES DE LA RECHERCHE .....   | 21 |
| OBJECTIFS .....  | 22 |
| 1.    OBJECTIF PRINCIPAL .....   | 22 |
| 2.    OBJECTIFS SECONDAIRES .....  | 22 |
| MATERIEL ET METHODES .....   | 23 |
| 1.    TYPE D'ETUDE : .....   | 23 |
| 2.    POPULATION D'ETUDE : .....   | 23 |
| 3.    CRITERES D'INCLUSION ET D'EXCLUSION : .....                            | 26 |
| 4.    MODALITES DE LA RELECTURE ET IHC.....                                  | 26 |
| 5.    RECHERCHE DE MUTATION <i>MYD88</i> L265P : .....                       | 28 |
| 6.    RECUEIL DES DONNEES CLINIQUES : .....                                  | 31 |
| 7.    ANALYSES STATISTIQUES : .....  | 32 |
| RESULTATS.....   | 34 |
| 1.    CONSIDERATIONS PRE-ANALYTIQUES : .....                                 | 34 |
| 2.    RELECTURE CENTRALISEE : .....  | 35 |

|      |   |     |
|------|---|-----|
| 3.   | DETERMINATION DE LA COO :.....  | 42  |
| 4.   | EXPRESSION PROTEIQUE DE BCL2 ET MYC :.....                                      | 48  |
| 5.   | IMPACT DE LA COO SUR LA SURVIE :.....   | 52  |
| 5.1. | SURVIE SANS PROGRESSION :.....  | 52  |
| 5.2. | SURVIE GLOBALE :.....   | 56  |
| 5.3. | SURVIE SANS EVENEMENT :.....  | 59  |
| 6.   | VALEUR PRONOSTIQUE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES BCL2 ET MYC.....               | 67  |
| 6.1. | SURVIE SANS PROGRESSION :.....  | 67  |
| 6.2. | SURVIE GLOBALE :.....   | 71  |
| 6.3. | SURVIE SANS EVENEMENT :.....  | 75  |
| 7.   | DETECTION DE LA MUTATION <i>MYD88</i> L265P .....                               | 81  |
| 7.1. | FREQUENCE DE MUTATION ET DONNEES CLINIQUES.....                                 | 81  |
| 7.2. | DONNEES DE SURVIE SELON LE STATUT MUTATIONNEL <i>MYD88</i> L265P.....           | 86  |
|      | DISCUSSION .....  | 88  |
| 1.   | L'ALGORITHME DE HANS, UN OUTIL INSUFFISANT DANS LA DETERMINATION DE LA COO ?..  | 88  |
| 2.   | EXCELLENT PRONOSTIC DES PMBL AU PRIX D'UNE SUREXPOSITION A LA CHIMIOOTHERAPIE ? | 91  |
| 3.   | DES FACTEURS PRONOSTIQUES « CLINIQUES » TOUJOURS RELEVANTS .....                | 92  |
| 4.   | RELEVANCE PRONOSTIQUE DES PROTEINES BCL2 ET MYC EN IHC ? .....                  | 92  |
| 5.   | ABSENCE DE VALEUR PRONOSTIQUE DE LA MUTATION L265P DU GENE <i>MYD88</i> : ..... | 94  |
| 6.   | PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES.....  | 96  |
|      | CONCLUSION .....  | 98  |
|      | BIBLIOGRAPHIE.....  | 99  |
|      | RESUME .....  | 103 |

## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1 : Schéma récapitulatif des différents lymphomes et de leur contre-partie lymphocytaire normale dans la différenciation cellulaire B.</b> .....                  | 16 |
| <b>Figure 2 : Algorithme de Hans.</b> .....   | 17 |
| <b>Figure 3 : Schéma thérapeutique de l'essai GOELAMS-075.</b> .....  | 25 |
| <b>Figure 4 : Considérations pré-analytiques, disponibilité du matériel, type de prélèvement et hétérogénéité de fixateurs.</b> .....                                       | 35 |
| <b>Figures 5a, 5b, 5c : Données de la relecture globale et par bras de traitement.</b> .....  | 37 |
| <b>Figure 6 : Diagramme de flux décrivant le processus et les résultats de la relecture dans l'essai GOELAMS-075.</b> .....   | 38 |
| <b>Figure 7 : Survie sans progression dans la population de LBDGC diagnostic confirmé avec donnée disponible (n=294) en fonction du bras de traitement.</b> .....           | 53 |
| <b>Figure 8 : Survie sans progression selon le sous-type COO.</b> .....   | 55 |
| <b>Figure 9 : Survie globale dans la population de LBDGC diagnostic confirmé (n=296) en fonction du bras de traitement.</b> .....   | 56 |
| <b>Figure 10 : Survie globale selon le sous-type COO.</b> .....   | 58 |
| <b>Figure 11 : Survie sans évènement dans la population de LBDGC diagnostic confirmé avec donnée disponible (n=294) en fonction du bras de traitement.</b> .....            | 59 |
| <b>Figure 12 : Survie sans évènement selon le sous-type COO.</b> .....  | 60 |
| <b>Figure 13 : Répartition du type de premier évènement « EFS » dans les différents sous-types COO.</b> .....   | 62 |
| <b>Figure 14 : Flowchart des cas diagnostic confirmé (n=296) en fonction du traitement.</b> .....   | 63 |
| <b>Figure 15 : Flowchart des cas GC en fonction du traitement.</b> .....  | 64 |
| <b>Figure 16 : Flowchart des cas NGC en fonction du traitement.</b> .....   | 65 |
| <b>Figure 17 : Flowchart des cas PMBL en fonction du traitement.</b> .....  | 66 |
| <b>Figure 18 : Survie sans progression selon l'expression de la protéine BCL2.</b> .....  | 68 |
| <b>Figure 19 : Survie sans progression selon l'expression de la protéine MYC.</b> .....   | 69 |
| <b>Figure 20 : Survie sans progression selon la coexpression de MYC et BCL2.</b> .....  | 70 |
| <b>Figure 21 : Survie globale selon l'expression de la protéine BCL2.</b> .....   | 72 |
| <b>Figure 22 : Survie globale selon l'expression de la protéine MYC.</b> .....  | 73 |
| <b>Figure 23 : Survie sans progression selon la coexpression de MYC et BCL2.</b> .....  | 74 |
| <b>Figure 24 : Survie sans évènement selon l'expression de la protéine BCL2.</b> .....  | 76 |
| <b>Figure 25 : Survie sans évènement selon l'expression de la protéine MYC.</b> .....   | 77 |
| <b>Figure 26 : Survie sans évènement selon la coexpression de MYC et BCL2.</b> .....  | 78 |
| <b>Figure 27 : Répartition du type de premier évènement « EFS » en fonction de l'expression de BCL2, de l'expression de MYC et de la coexpression de MYC et BCL2.</b> ..... | 80 |
| <b>Figure 28 : Flowchart de la recherche de mutation L265P du gène MYD88.</b> .....   | 82 |
| <b>Figure 29 : Survie sans progression selon le statut MYD88 L265P.</b> .....   | 86 |
| <b>Figure 30 : Survie globale selon le statut MYD88 L265P.</b> .....  | 87 |
| <b>Figure 31 : Survie sans évènement selon le statut MYD88 L265P.</b> .....   | 87 |
| <b>Figure 32 : Voies de signalisation oncogéniques dans le LBDGC de type GC.</b> .....  | 97 |
| <b>Figure 33 : Voies de signalisation oncogéniques dans le LBDGC de type ABC.</b> .....   | 97 |

## LISTE DES TABLES

|   |    |
|---|----|
| Table 1 : Index Pronostique International (IPI) et IPI ajusté à l'âge (aaIPI), et taux de survie globale correspondants. ....                 | 12 |
| Table 2 : Score IPI et IPI- Révisé (R-IPI), et taux de survie globale correspondants .....  | 13 |
| Table 3 : Anticorps utilisés en IHC, références et modalités de lecture (type de marquage et seuils de positivité retenus).....               | 28 |
| Table 4 : Conditions d'amplification et programme de PCR utilisés pour la détection du statut mutationnel c.794T>C du gène <i>MYD88</i> ..... | 30 |
| Table 5 : Progression et rechute dans les différents sous-types de COO .....  | 54 |

## LISTE DES TABLEAUX

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1 : Caractéristiques cliniques de l'intégralité de la population de l'essai GOELAMS-075 (n=323) et des cas avec confirmation diagnostique de LBDGC (n=296)..... | 40 |
| Tableau 2 : Caractéristiques cliniques en fonction du bras de traitement dans la population d'étude (n=296).....  | 41 |
| Tableau 3 : Caractéristiques cliniques du sous-type GC (n=81) et répartition selon le bras de traitement .....  | 43 |
| Tableau 4 Caractéristiques cliniques du sous-type NGC (n=108) et répartition selon le bras de traitement .....  | 44 |
| Tableau 5 : Caractéristiques cliniques du sous-type GC (n=70) et répartition selon le bras de traitement .....  | 45 |
| Tableau 6 : Comparaison des caractéristiques cliniques entre les différents sous-types de COO .....   | 47 |
| Tableau 7 : Données d'expression protéique de BCL2 et MYC en fonction du bras de traitement .....   | 49 |
| Tableau 8 : Données d'expression protéique de BCL2 et MYC en fonction du sous-type COO .  | 50 |
| Tableau 9 : Données d'expression protéique de BCL2 et MYC en fonction du sous-type COO et du bras de traitement. ....   | 51 |
| Tableau 10 : Caractéristiques cliniques en fonction du statut MYD88 L265P (n=141).....  | 84 |
| Tableau 11 : Données d'évènements selon le statut MYD88 L265P (n=141) .....   | 85 |

# LISTE DES ABREVIATIONS

**aaIPI** : Index Pronostique International ajusté à l'âge  
**ABC** : Activated B-Cell  
**ASCO** : American Society of Clinical Oncology  
**BCL2** : B-Cell Lymphoma 2, molécule anti-apoptotique  
**BCL6** : B-Cell Lymphoma 6, facteur de transcription  
**BCR** : B-Cell Receptor  
**BEAM** : Carmustine ou BCNU, Etoposide, Aracytine, Melphalan  
**BOM** : Biopsie Ostéo-Médullaire  
**CD10** : Cluster de Différenciation 10  
**CD20** : Cluster de Différenciation 20  
**COO** : Cell Of Origin ou Cellule d'Origine  
**EFS** : Event Free Survival ; cette abréviation est utilisée dans notre étude pour la survie sans évènement  
**GC** : Germinal Center  
**GEP** : Gene Expression Profiling  
**HR** : Hazard-Ratio  
**IHC** : Immuno-Histo-Chimie  
**IC95%** : Intervalle de confiance à 95%  
**INCa** : Institut National du Cancer  
**IPI** : Index Pronostique International  
**LBDGC** : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules  
**LDH** : Lactate DésHydrogénase  
**LNH** : Lymphome Non Hodgkinien  
**Lymphopath** : Réseau d'expertise national en anatomopathologie pour le lymphome. Les membres, experts en hématopathologie, sont chargés de la double lecture diagnostique par l'INCa.  
**MUM1** : Multiple Myeloma oncogen 1  
**MYC** : oncoprotéine impliquée dans la régulation de la transcription de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose  
**MYD88** : MYeloid Differentiation primary response 88  
**NFkB** : Nuclear Factor Kappa-B  
**NGC** : Non Germinal Center  
**OS** : Overall Survival ; cette abréviation est utilisée dans notre étude pour la survie globale  
**PFS** : Progression Free Survival ; cette abréviation est utilisée dans notre étude pour la survie sans progression  
**PMBL** : Primary Mediastinal B-cell Lymphoma  
**R-CEEP** : Rituximab, Cyclophosphamide, Eldisine, Epirubicine, Prednisone  
**RCHOP** : Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Prednisone  
**R-IPI** : Index Pronostique International Révisé  
**R-MTX-AraC** : Rituximab, Méthotrexate, Aracytine  
**SNC** : Système Nerveux Central  
**TEP** : Tomographie par Emission de Positons  
**TLR** : Toll-Like Receptor

# INTRODUCTION

En 2010, en France, environ 11 000 nouveaux cas de lymphome non hodgkinien (LNH) ont été diagnostiqués. Les LNH représentent 3% de l'ensemble des cancers et se situent au 7<sup>ème</sup> rang des cancers les plus fréquents chez l'homme et au 6<sup>ème</sup> rang chez la femme (données INCa 2012). On observe une augmentation constante de l'incidence des LNH au cours des 30 dernières années, de l'ordre de 3% par an (données INCa 2010).

Le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) est l'entité histologique la plus fréquente des LNH (35% des LNH) et l'une des plus agressives.

## 1. DONNEES DE SURVIE A L'ERE DU RITUXIMAB :

Le pronostic s'est nettement amélioré depuis 10 ans avec l'utilisation du Rituximab, anticorps monoclonal anti-CD20 en association à la chimiothérapie. La survie globale (ou *Overall Survival* « OS ») à 5 ans après traitement de première ligne par immuno-chimiothérapie de type RCHOP (Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Prednisone) est estimée à 80% chez les sujets de moins de 60 ans(1) et à 58% chez les 60-80 ans(2). Malgré des progrès thérapeutiques considérables, environ un tiers des patients font l'expérience d'une maladie réfractaire ou d'une rechute. Le pronostic de ces derniers est péjoratif avec une survie globale à 3 ans estimée à 49% et une survie sans progression (ou *Progression Free Survival* « PFS ») à 3 ans estimée à 37%, significativement impactée par l'exposition préalable au Rituximab et le délai de rechute inférieur à 12 mois (PFS à 3 ans = 23%)(3). La majorité des rechutes surviennent dans les deux premières années post-traitement, il n'est pas rare cependant d'observer des rechutes tardives au-delà de 5 ans après traitement de première ligne.

## 2. INTENSIFICATION THERAPEUTIQUE EN 1<sup>ERE</sup>

### LIGNE :

La place de l'intensification thérapeutique reste à définir dans le traitement de 1<sup>ère</sup> ligne du LBDGC. Si elle apportait un bénéfice en survie globale aux patients de plus mauvais pronostic à l'ère pré-Rituximab(4)(5), son intérêt n'a pas été démontré en consolidation d'une chimiothérapie de type RCHOP pour les patients répondeurs. Le rationnel d'exposition des patients à une chimiothérapie intensive avec le risque de toxicité surajoutée est de plus remis en question par l'utilisation de l'imagerie fonctionnelle en cours de traitement. L'essai multicentrique randomisé GOELAMS-075 tentait de répondre à ces interrogations dans une population de 340 patients âgés de 18 à 60 ans, avec LBDGC de stade Ann Arbor III-IV ou de stade I-II avec forte masse tumorale non préalablement traités. Il comparait l'immunochimiothérapie de référence RCHOP14 (huit cycles) à un régime dit « intensif » constitué de deux cures de R-CEEP (Rituximab, Cyclophosphamide, Eldisine, Epirubicine, Prednisone) et d'une cure de R-MTX-AraC (Rituximab, Méthotrexate, Aracytine) suivies en cas de bonne réponse d'une intensification thérapeutique de type BEAM (Carmustine ou BCNU, Etoposide, Aracytine, Melphalan) avec réinjection d'un greffon autologue. La réponse au traitement après quatre cures de RCHOP14 ou à l'issue de la cure de R-MTX-AraC dans le bras intensif était définie sur la base de la TEP (Tomographie par Emission de Positons) qui guidait la prise en charge thérapeutique ultérieure. Pour les patients non répondeurs (TEP positive selon l'échelle visuelle), un traitement de rattrapage était réalisé suivi d'une intensification thérapeutique par BEAM et autogreffe, quel que soit le bras initial de randomisation (**Figure 3**). Bien que les résultats définitifs n'aient pas été publiés, les données préliminaires présentées à l'ASCO en 2011 ne semblaient pas démontrer de supériorité du régime intensif sur le traitement par RCHOP14. Cependant la réévaluation des résultats à la lumière de facteurs pronostiques surajoutés pourrait permettre d'identifier des patients pouvant bénéficier de l'intensification thérapeutique en 1<sup>ère</sup> ligne.

### 3. FACTEURS PRONOSTIQUES CLINIQUES :

Les stratégies thérapeutiques actuelles ont pour objectif l'obtention de la meilleure réponse possible au traitement dans l'espoir d'une guérison définitive. Elles reposent sur la caractérisation de la maladie avant traitement et de son pronostic intrinsèque représentés par l'Index Pronostique International (IPI)(6) qui comprend les items suivant : l'âge ( $\leq 60$  ans *versus*  $>60$  ans), le Performance Status (0-1 *versus*  $\geq 2$ ), le stade Ann Arbor (I-II *versus* III-IV), le taux de LDH ( $\leq 1N$  *versus*  $>1N$ ), le nombre d'atteinte extra-ganglionnaire ( $\leq 1$  *versus*  $>1$ ). Un score dit « ajusté à l'âge » ou aalPI est proposé pour le groupe de patients  $\leq 60$  ans, constitué de trois variables : le Performance Status (0-1 *versus*  $\geq 2$ ), le stade Ann Arbor (I-II *versus* III-IV) et le taux de LDH ( $\leq 1N$  *versus*  $>1N$ ).

Ces scores aboutissent à une stratification du risque définissant différents groupes pronostiques (**Table 1**):

| Groupe pronostique                              | Score | Survie globale à 5 ans |
|---|-------|------------------------|
| <b>IPI</b>                                      |       |                        |
| Risque faible                                   | 0-1   | 73%                    |
| Risque faible-intermédiaire                     | 2     | 51%                    |
| Risque intermédiaire élevé                      | 3     | 43%                    |
| Risque élevé                                    | 4-5   | 26%                    |
| <b>aalPI, patients <math>\leq 60</math> ans</b> |       |                        |
| Risque faible                                   | 0     | 83%                    |
| Risque faible-intermédiaire                     | 1     | 69%                    |
| Risque intermédiaire élevé                      | 2     | 46%                    |
| Risque élevé                                    | 3     | 32%                    |

D'après Shipp et al, Predictive model for aggressive non-Hodgkin's Lymphoma, NEJM 1993

**Table 1** : Index Pronostique International (IPI) et IPI ajusté à l'âge (aalPI), et taux de survie globale correspondants.

Le score IPI a été évalué à l'ère du Rituximab. Une nouvelle définition a été proposée par Sehn et al.(7) sur une cohorte rétrospective monocentrique de 365

patients traités par RCHOP: le R-IPI (Revised-IPI) comprenant comme facteurs pronostiques l'âge ( $\leq 60$  ans *versus*  $>60$  ans), le Performance Status (0-2 *versus*  $>2$ ), le stade Ann Arbor (I-II *versus* III-IV), le taux de LDH ( $\leq 1N$  *versus*  $>1N$ ), le nombre d'atteinte extra-ganglionnaire ( $\leq 1$  *versus*  $>1$ ). Par comparaison à l'IPI, les valeurs prises en compte dans le Performance Status sont différentes. Ce nouveau score propose une stratification plus radicale par rapport à l'IPI qui garde en partie sa valeur pronostique (**Table 2**) :

| Groupe pronostique  | Score | Survie globale à 4 ans |
|---|-------|------------------------|
| <b>IPI</b>  |       |                        |
| Risque faible   | 0-1   | 82%                    |
| Risque faible-intermédiaire   | 2     | 81%                    |
| Risque intermédiaire élevé  | 3     | 49%                    |
| Risque élevé  | 4-5   | 59%                    |
| <b>R-IPI</b>  |       |                        |
| Pronostic très favorable  | 0     | 94%                    |
| Pronostic favorable   | 1-2   | 79%                    |
| Pronostic défavorable   | 3-5   | 55%                    |
| D'après Sehn et al, The Revised International Prognostic Index is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP, Blood 2007 |       |                        |

**Table 2 : Score IPI et IPI- Révisé (R-IPI), et taux de survie globale correspondants**

A l'heure actuelle, en pratique courante, l'IPI et l'aalPI restent les scores pronostiques de référence. Il existe des disparités en terme pronostique au sein de chaque sous-groupe de risque déterminé, suggérant la présence d'autres marqueurs pronostiques non pris en compte lors de l'évaluation clinique.

## 4. CELLULE D'ORIGINE

### 4.1. DETERMINATION DE L'ORIGINE CELLULAIRE DU LYMPHOME :

Au début des années 2000, avec l'avènement des nouvelles techniques de biologie moléculaire (séquençage du génome, analyse du transcriptome, hybridation sur puces), l'hétérogénéité du LBDGC a été mise en avant et le concept de cellule d'origine (COO) est apparu en raison des similitudes entre la cellule tumorale et sa contrepartie lymphocytaire normale au cours de la différenciation lymphocytaire B. Plusieurs catégories ont alors été définies sur la base des profils d'expression génique (GEP) :

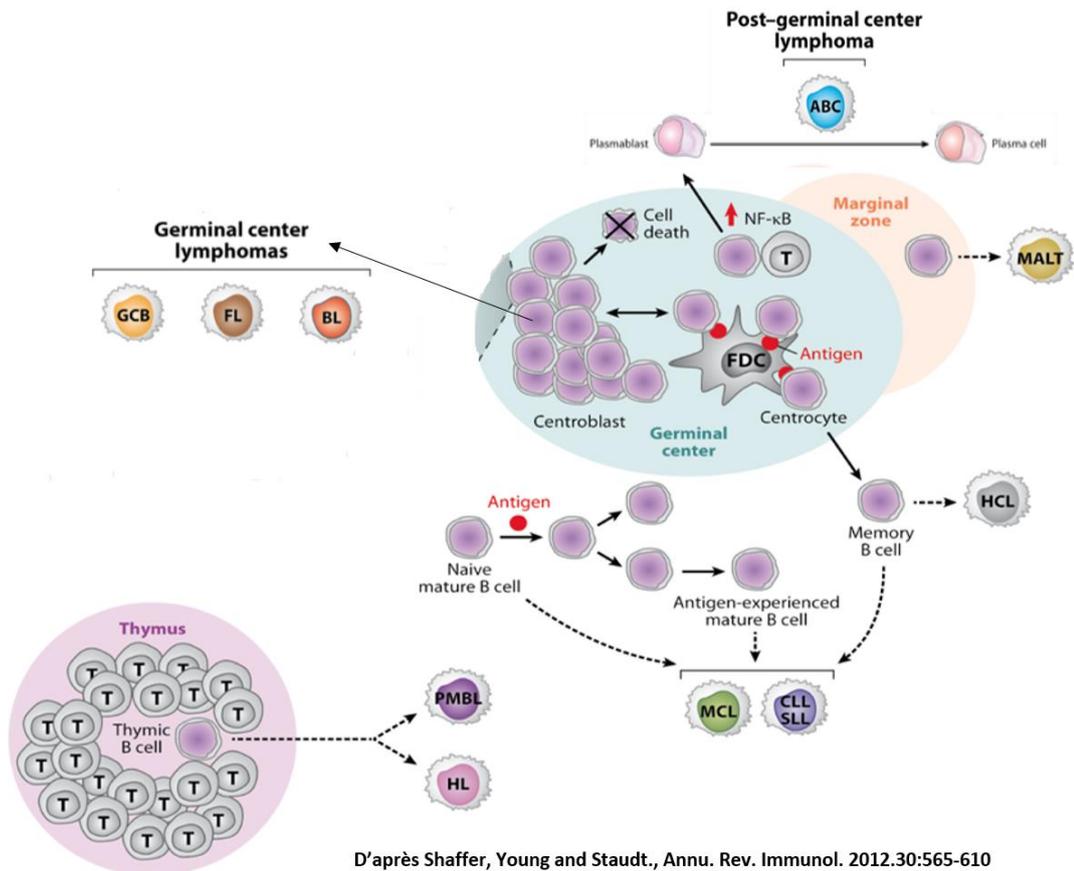
- le LBDGC de phénotype GC (Germinal Center) au profil d'expression proche du centroblaste normal et exprimant des marqueurs phénotypiques similaires,
- le LBDGC de phénotype ABC (Activated B-Cell) au profil d'expression proche du lymphocyte B normal de la zone post centro-germinative, exprimant des facteurs de transcription engageant le lymphocyte B vers la différenciation plasmocytaire.

Ces deux sous-types décrits par Alizadeh en 2000(8) avaient des pronostics radicalement différents : survie globale à 5 ans de 76% pour le sous-type GC *versus* 16% pour le sous-type ABC. Ces résultats de survie sont cependant à mettre en balance avec le faible effectif de patients analysés (n=42) et traités par polychimiothérapie comportant des anthracyclines sans Rituximab. Une étude rétrospective conséquente de détermination de la valeur pronostique de la COO en GEP menée par l'équipe de Randy Gascoyne(9) sur 344 cas de LBDGC traités par RCHOP retrouvait des taux de survie globale à 5 ans de 78% et de 56% pour les sous-types GC et ABC respectivement ( $p < 0,001$ ), confortant la validité pronostique de la COO à l'ère du Rituximab. Des résultats équivalents avaient été obtenus par Lenz et al. en 2008(10).

Un troisième sous-type a été décrit sur le plan clinico-pathologique et moléculaire en 2003 par Rosenwald et al.(11) et en 2008 par Lenz et al.(12) :

- le LBDGC de type primitif du médiastin (PMBL) au profil d'expression proche du lymphocyte B résident thymique et partageant par ailleurs des similitudes phénotypiques et moléculaires avec le lymphome Hodgkinien. La survie globale à 5 ans a été évaluée pour 274 patients inclus dans l'étude de Rosenwald, traités par polychimiothérapie sans Rituximab : 64% pour les PMBL *versus* 59% pour les GC et 30% pour les ABC. Peu d'études exclusivement dédiées au sous-type PMBL sont disponibles dans la littérature à l'ère du Rituximab. Les données concernent essentiellement des analyses de sous-groupes : on peut citer l'essai MInT comparant le CHOP au RCHOP où l'adjonction du Rituximab permettait d'obtenir un taux de survie globale à 3 ans de 89% pour les 87 patients PMBL analysés(13).

Cette nouvelle classification a permis une compréhension plus exhaustive de la physiopathologie du LBDGC, et des lymphomes B en général, à partir des observations issues de la recherche fondamentale sur la maturation lymphocytaire B normale(14) (**Figure 1**).



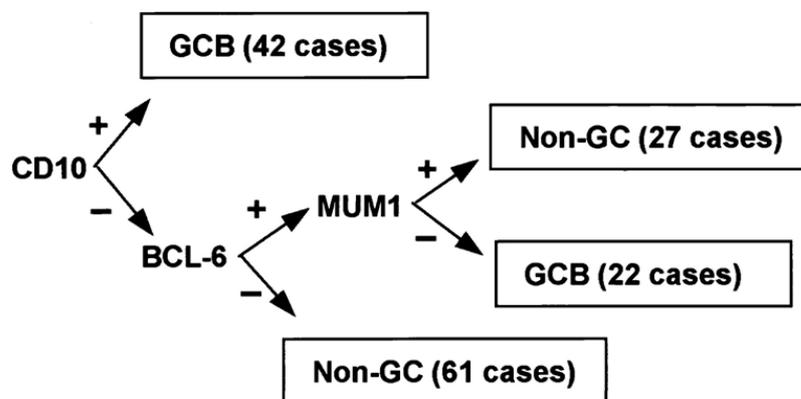
**Figure 1 : Schéma récapitulatif des différents lymphomes et de leur contre-partie lymphocytaire normale dans la différenciation cellulaire B.** ABC = Activated B-Cell lymphoma ; BL = Burkitt Lymphoma ; CLL/SLL = Chronic Lymphocytic Leukemia/ Small Lymphocytic Lymphoma ; FDC = Follicular Dendritic Cell ; FL = Follicular Lymphoma ; GCB = Germinal Center B cell lymphoma ; HL = Hodgkin Lymphoma ; HCL = Hairy Cell Leukemia ; MALT = Mucosa Associated Lymphoid Tissue ; MCL = Mantle Cell Lymphoma ; PMBL = Primary Mediastinal B Cell Lymphoma.

Des efforts considérables ont été menés pour tenter de transposer cette classification en routine par immunohistochimie (IHC) afin de minimiser les contraintes et les coûts imposés par la technique d'analyse du GEP.

#### 4.2. APPLICATION EN ROUTINE DE LA DETERMINATION DE LA COO PAR IHC :

Une étude de corrélation de la détermination de la cellule d'origine en GEP (puces d'hybridation d'ADNc) et en IHC à partir de l'expression du CD10, de

BCL6 et de MUM1 a été conduite chez 142 patients traités par chimiothérapie de type CHOP et publiée en 2004 par Hans et al.(15) (**Figure 2**). Deux sous-types ont été définis : le sous-type GC, pendant phénotypique du sous-type GC « moléculaire » et le sous-type NGC, pendant phénotypique du sous-type ABC « moléculaire ». En comparaison à l'analyse GEP par puces à ADNc, l'algorithme immunohistochimique établi offrait une sensibilité de 71% pour la détermination du phénotype GC et de 88% pour celle du phénotype NGC. La survie globale à 5 ans était comparable entre les deux techniques dans les groupes GC et NGC avec une survie prolongée pour les formes de type GC (76% à 5 ans *versus* 34% pour les formes NGC).



Christine P. Hans et al. *Blood* 2004;103:275-282

**Figure 2 : Algorithme de Hans.** Il repose sur l'analyse séquentielle de l'immunomarquage CD10, BCL6 et MUM1.

La valeur pronostique de l'algorithme de Hans à l'ère du Rituximab est nettement plus controversée : certaines études confirment les observations initiales d'Alizadeh avec un pronostic moins bon en survie globale des formes NGC.(16,17) D'autres infirment ces résultats avec un pronostic similaire entre les formes GC et NGC.(18–23) D'autres algorithmes (Choi(24), Tally(16), Nyman(18)) ont été proposés sans pour autant afficher une supériorité par rapport à l'algorithme de Hans.

Le phénotype PMBL repose essentiellement sur une caractérisation clinique et morphologique. Cette entité se distingue par une prédominance féminine, survenant le plus souvent entre 30 et 40 ans et un syndrome de masse médiastinal antérieur avec parfois un envahissement des structures avoisinantes voire de façon plus rare une dissémination à distance. On retrouve de façon constante une fibrose vaguement nodulaire délimitant des zones de cellules lymphoïdes nucléolées de taille moyenne à grande, B CD20+ fréquemment CD30+ (80% des cas) et CD23+ (70% des cas). Lorsque l'algorithme de Hans est appliqué cette forme est dans la grande majorité des cas de type NGC.

## 5. CYTOGENETIQUE ET EXPRESSION DES PROTEINES BCL2 ET MYC :

En cytogénétique, l'impact pronostique des translocations impliquant les oncogènes *C-MYC*, *BCL2* et *BCL6* a été rapporté dans plusieurs études, et bien que le rôle des translocations de *BCL2* et *BCL6* restent encore à définir, la translocation du gène *C-MYC* apparaît associée à un pronostic défavorable après traitement par RCHOP avec un taux de survie globale allant de 33% à 57% à 5 ans(17,25,26). Cet impact négatif est probablement à attribuer à la nature du partenaire de translocation puisque dans une large étude rétrospective récente, seule la translocation impliquant *C-MYC* et *IGH* était retrouvée comme de mauvais pronostic, alors que l'impact négatif du réarrangement de *C-MYC* disparaissait avec un autre partenaire(27). La translocation de *C-MYC* est retrouvée dans 10 à 15% des cas de LBDGC. Dans 5% des cas elle est associée à une translocation de *BCL2* et/ou de *BCL6* (lymphome double-hit / triple-hit).

A l'instar de la COO en GEP et de sa transposition en routine, l'expression des protéines BCL2 et MYC a été largement étudiée en IHC. Les résultats de nombreuses études sont là encore contradictoires et les seuils de positivité choisis pour BCL2 ne sont pas toujours homogènes, les plus fréquemment retrouvés étant 50% et 70%. L'ajout du Rituximab à la chimiothérapie a gommé

le pronostic défavorable initialement décrit des cas surexprimant BCL2. De la même manière, la valeur pronostique de la surexpression de MYC n'est pas confirmée à l'ère du Rituximab.

En revanche, plusieurs équipes ont décrit un pronostic péjoratif des cas coexprimant ces deux protéines (aux seuils de positivité de BCL2 à 50% et à 70%). La survie globale de ces cas était de 36% à 5 ans lorsque le seuil de BCL2 à 50% était utilisé(28). Une seconde étude utilisant le seuil de BCL2 à 70% retrouvait un taux de survie globale à 3 ans de 43%(17). Ces résultats reposent cependant sur des études rétrospectives avec patients sélectionnés sur la disponibilité du matériel.

## 6. MUTATIONS SOMATIQUES :

Des mutations somatiques récurrentes ont été récemment mises en évidence dans le LBDGC comme les mutations portant sur des gènes impliqués dans la signalisation du récepteur BCR (B-Cell Receptor), des TLR (Toll-Like Receptors) ou de la voie NFκB (*CARD11*, *CD79a* et *CD79b*, *MYD88*).(29–31) La mutation L265P du gène *MYD88* est la mutation la plus fréquente au sein du LBDGC:

- 36% dans le LBDGC primitif du système nerveux central(32) (SNC) et 69% dans le LBDGC primitif cutané de type jambe(33) (entités histologiques non concernées par notre étude),
- 69% dans le LBDGC de type testiculaire(34),
- 30% dans le LBDGC « ganglionnaire », essentiellement dans les formes de type NGC, supposées de plus mauvais pronostic intrinsèque.

Sa valeur pronostique a été rapportée dans une étude espagnole rétrospective hétérogène de 175 patients âgés de 25 à 88 ans (âge médian 70 ans), incluant 10% de formes primitives du SNC, cutanée et testiculaire(35). La présence de la mutation *MYD88* L265P (n=17/175, 9,7%) était comme attendu plus fréquemment associée aux formes extra-ganglionnaires primitives (71% *versus*

29% avec une forme « ganglionnaire »). Soixante-seize pourcents des cas mutés étaient des sujets  $\geq 60$  ans. La mutation était associée à une PFS et une OS inférieures à 4 ans de suivi (Hazard-Ratio (HR) PFS= 2,4 p= 0,02 ; HR OS= 3,4 p= 0,002).

En l'absence d'anticorps monoclonal disponible permettant la détection en IHC de la protéine mutée, la recherche de la mutation *MYD88* L265P est rendue possible en biologie moléculaire par séquençage NGS, par séquençage Sanger ou par PCR en temps réel à partir de matériel frais ou congelé mais également à partir de matériel fixé inclus en paraffine.

## HYPOTHESES DE LA RECHERCHE

La valeur prédictive de la détermination de la COO en IHC et de l'expression des protéines BCL2 et MYC reste controversée à l'ère du Rituximab.

L'impact pronostique de la mutation L265P du gène *MYD88* n'a pas été démontré dans le LBDGC dans une étude prospective.

La cohorte de l'essai GOELAMS-075, par son effectif conséquent et son schéma original, pourrait permettre de répondre à la question de la valeur pronostique de :

- la détermination de la COO selon Hans,
- l'expression des protéines BCL2 et MYC,
- la mutation L265P du gène *MYD88*,

dans le LBDGC de stade avancé au diagnostic chez le sujet jeune et d'évaluer le meilleur traitement à proposer aux formes supposées de plus mauvais pronostic: stratégie classique ou intensive.

# OBJECTIFS

## 1. OBJECTIF PRINCIPAL

- Evaluer l'impact pronostique de la détermination de la COO selon l'algorithme de Hans au diagnostic sur la survie sans progression (PFS) à 5 ans.

## 2. OBJECTIFS SECONDAIRES

- Evaluer l'impact pronostique de la détermination de la COO selon l'algorithme de Hans au diagnostic sur la survie sans évènement (EFS) à 5 ans et sur la survie globale (OS) à 5 ans.
- Evaluer l'impact pronostique de l'expression des protéines BCL2 et MYC au diagnostic sur la survie sans progression à 5 ans, sur la survie sans évènement à 5 ans, et sur la survie globale à 5 ans.
- Décrire les caractéristiques clinico-biologiques des cas mutés *MYD88* L265P
- Evaluer l'impact pronostique de la mutation L265P du gène *MYD88* au diagnostic sur la survie sans progression à 5 ans, sur la survie sans évènement à 5 ans, et sur la survie globale à 5 ans.

# MATERIEL ET METHODES

## 1. TYPE D'ETUDE :

Etude pronostique de la détermination de la COO en IHC par l'algorithme de Hans, de l'expression des protéines BCL2 et MYC et de la mutation L265P du gène *MYD88* au diagnostic de LBDGC sur prélèvements histologiques des patients inclus dans l'essai clinique national multicentrique randomisé GOELAMS-075.

## 2. POPULATION D'ETUDE :

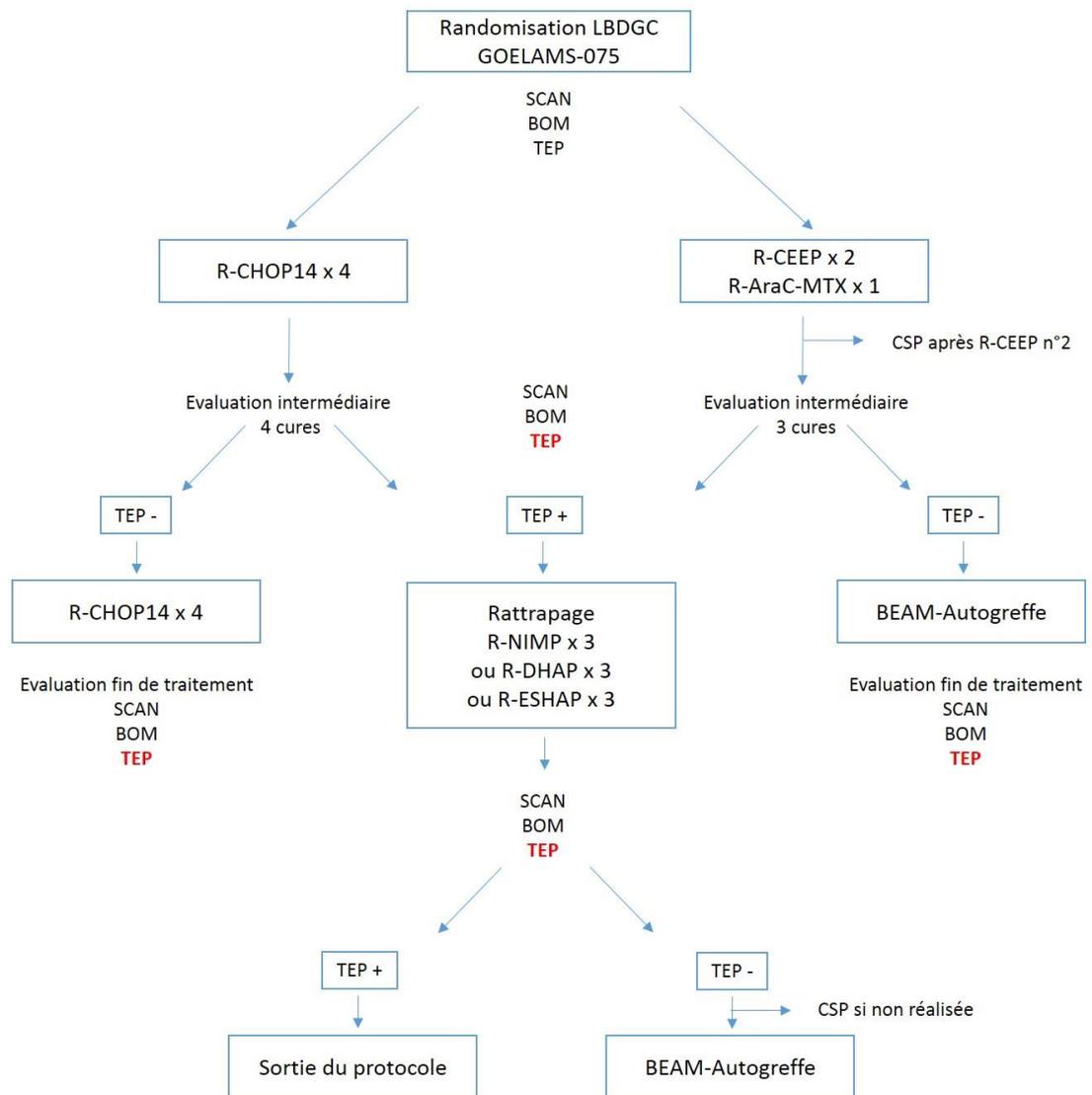
L'essai clinique randomisé multicentrique GOELAMS-075 «Traitement de première intention des lymphomes B agressifs de l'adulte jeune (18-60 ans) : Comparaison d'une polychimiothérapie intensive avec Rituximab à une chimiothérapie par CHOP-14 avec Rituximab», posait la question du meilleur traitement à proposer à l'adulte jeune atteint de LBDGC de stade avancé non traité préalablement avec comme objectif principal la survie sans évènement à 3 ans. Cet essai thérapeutique a permis l'inclusion de 340 patients et la randomisation de 335 d'entre eux du 19/05/2005 au 01/06/2010, et est clos depuis le 31/05/2013.

Les critères d'inclusion dans l'essai étaient :

- un âge compris entre 18 et 60 ans ;
- un diagnostic histologique de LBDGC CD20+ ;
- un stade Ann Arbor avancé : I-II avec masse tumorale >7cm ou III-IV ;
- non préalablement traité ;
- VIH négatif ;
- consentement éclairé et signé.

Les critères d'exclusion comportaient : un âge inférieur à 18 ans ou supérieur à 60 ans ; un diagnostic de LNH non LBDGC, de lymphome lymphoblastique, de lymphome de Burkitt, de transformation agressive d'un LNH de bas grade pré-existant, de lymphome primitif du SNC ou de lymphome post-transplantation ; l'absence d'expression du CD20 ; un stade I ou II Ann Arbor sans masse tumorale >7cm ; un traitement préalable à l'exception d'une corticothérapie (dose maximale 2 mg/kg/jour pendant un maximum de 5 jours) ou la réalisation d'une cure de R-COP dans les 7 jours ; VIH positif ; contre-indication à l'utilisation du Rituximab ou contre-indication à la réalisation d'une chimiothérapie intensive (défaillance organique non liée au lymphome) ; cancer ou antécédent de cancer à l'exception du carcinome du col utérin in situ et du carcinome épithélial cutané in situ ; patient atteint d'une déficience ne lui permettant pas une bonne compréhension des impératifs du traitement ; consentement éclairé non signé.

La randomisation était effectuée en 1:1 avec une stratification par centre. Le schéma de traitement est présenté en **Figure 3**.



**Figure 3 : Schéma thérapeutique de l'essai GOELAMS-075.** Randomisation en 1:1.

BEAM= BCNU (Carmustine), Etoposide, Aracytine, Melphalan ; BOM= biopsie ostéo-médullaire ; CSP= recueil cellules souches périphériques ; SCAN= scanner corps entier ; RCHOP14= Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Prednisone ; R-CEEP= Rituximab, Cyclophosphamide, Eldisine, Epirubicine, Prednisone ; R-AraC-MTX= Rituximab, Aracytine, Methotrexate ; R-DHAP= Rituximab, Dexamethasone, Aracytine haute dose, Cisplatine ; R-NIMP= Rituximab, Vinorelbine, Ifosfamide, Mitoxantrone, Prednisone ; R-ESHAP= Rituximab, Etoposide, Prednisone, Aracytine, Cisplatine.

La TEP était analysée localement selon l'échelle visuelle. En cas de positivité à l'évaluation intermédiaire, un rattrapage était débuté avec intensification thérapeutique et autogreffe pour les patients répondeurs.

### 3. CRITERES D'INCLUSION ET D'EXCLUSION :

Les critères d'inclusion dans la présente étude pronostique étaient les suivants :

- Patients inclus et randomisés dans l'essai GOELAMS-075
- Matériel au diagnostic disponible inclus en paraffine ou congelé ou lames initiales HES (coloration Hématoxyline-Eosine-Safran) et IHC
- Confirmation diagnostique de LBDGC CD20+ par relecture de l'expert Lymphopath (Dr Marie Parrens, service d'Anatomopathologie Hôpital Haut Lévêque CHU Bordeaux)

Les critères d'exclusion étaient :

- Patients non inclus ou inclus non-randomisés dans l'essai GOELAMS-075
- Absence de matériel diagnostique disponible
- Diagnostic de LBDGC CD20+ infirmé par l'expert Lymphopath

### 4. MODALITES DE LA RELECTURE ET IHC

Une requête de matériel histologique diagnostique (bloc d'inclusion en paraffine et lames colorées) a été adressée pour chaque patient inclus dans le service d'anatomopathologie initial correspondant pour relecture centralisée.

A partir de chaque bloc inclus en paraffine, des coupes de 3 µm ont été réalisées pour évaluation morphologique (coloration HES) et pour analyse immunohistochimique. Lorsque la quantité de matériel disponible le permettait, trois échantillons en zone tumorale de 0,6 mm de diamètre ont été prélevés pour inclusion en TMA (Tissue-MicroArrays, Beecher Instruments, Silver Spring, MD).

Les TMA ont été réalisés sur la plate-forme technique du LYSA-P (Lymphoma Study Association, section Pathologie, Hôpital Henri Mondor, Créteil).

La relecture a été effectuée en binôme avec l'expert Lymphopath (Dr Marie-Cécile Parrens et G. Labouré) dans le service d'anatomopathologie de l'hôpital Haut Lévêque au CHU de Bordeaux pour confirmation du diagnostic de LBDGC CD20+ selon la classification OMS 2008.

L'analyse immunohistochimique (IHC) a été réalisée sur automate Leica Bond avec les anticorps monoclonaux suivants : anti-CD20 et anti-CD5 pour confirmation du diagnostic ; anti-CD10, anti-BCL6, anti-MUM1 pour détermination de la COO par l'algorithme de Hans ; anti-Ki67, anti-BCL2 et anti-cMYC pour évaluation du niveau d'expression des protéines correspondantes. La révélation était réalisée avec le kit « DAB » *Bond Polymer Refine Detection* (Réf DS9800, Novocastra, Newcastle, Royaume-Uni) selon les recommandations du fournisseur. L'expression protéique était définie en double-lecture (Dr Parrens et G. Labouré) par le pourcentage de cellules tumorales positives, arrondi à la décimale la plus proche. En l'absence de témoin interne positif, le marquage était considéré comme non contributif.

Les références de chaque anticorps monoclonal, la dilution utilisée, le type de marquage et le seuil de positivité retenu sont présentés dans la **Table 3**.

| Antigène | Clone  | Source *                     | Dilution | Marquage      | Seuil de positivité |
|----------|--------|------------------------------|----------|---------------|---------------------|
| CD20     | L26    | Dako, réf M0755              | 1/400    | Cytoplasmique | NA                  |
| CD5      | 4C7    | Novocastra, réf NCL-CD5-4C7  | 1/150    | Cytoplasmique | NA                  |
| CD10     | 56C6   | Novocastra, réf NCL-CD10-270 | 1/100    | Cytoplasmique | 30%                 |
| BCL6     | PG-B6p | Dako, réf M7211              | 1/100    | Nucléaire     | 30%                 |
| MUM1     | MUM1p  | Dako, réf M7259              | 1/200    | Nucléaire     | 30%                 |
| BCL2     | 124    | Dako, réf M0887              | 1/200    | Cytoplasmique | 50% et 70%          |
| cMYC     | Y69    | Abcam, réf ab32072           | 1/100    | Nucléaire     | 40%                 |
| KI67     | MM1    | Novocastra, réf NCL-L-Ki67   | 1/25     | Nucléaire     | NA                  |

\* Dako, Glostrup, Danemark ; Novocastra, Newcastle, Royaume-Uni ; Abcam, Cambridge, Royaume-Uni.  
NA = non applicable

**Table 3 : Anticorps utilisés en IHC, références et modalités de lecture (type de marquage et seuils de positivité retenus).**

## 5. RECHERCHE DE MUTATION *MYD88* L265P :

Le formulaire de consentement de participation à l'essai GOELAMS-075 et la note d'information stipulaient explicitement la réalisation éventuelle d'analyse à des fins de recherche sur matériel ADN extrait du prélèvement histologique initial. Par conséquent aucun amendement supplémentaire n'a été adressé aux patients inclus.

L'extraction d'ADN génomique (ADNg) a été effectuée selon les techniques suivantes :

- sur matériel fixé inclus en paraffine : un prélèvement en zone tumorale sélectionnée à l'issue de la relecture a été réalisé. Après une étape de déparaffinage, l'ADNg a été extrait avec le kit QIAmp DNA FFPE<sup>®</sup> (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) selon les recommandations du fournisseur.
- sur matériel congelé : un fragment tissulaire de quelques mm<sup>3</sup> a été obtenu après découpe en condition d'asepsie stricte du matériel

congelé sans rompre la chaîne du froid. L'ADNg a été extrait par technique manuelle (étape de lyse cellulaire et digestion enzymatique à la Protéinase K, étape de purification au Phénol-Chloroforme et précipitation à l'Acétate de Sodium-Ethanol).

Les ADNg ont été dosés au spectrophotomètre NanoDrop1000® (Thermo Scientific, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Etats-Unis) puis stockés au congélateur à -20°C. Au moment de leur utilisation, une dilution a été effectuée pour obtenir une concentration de 100 ng/µl.

L'amplification de l'exon 5 du gène *MYD88* dans la région de mutation c.794T>C (p.L265P) a été réalisée à l'aide de deux amorces spécifiques (sens et anti-sens) flanquant de part et d'autre la région de mutation et produisant un produit d'amplification de petite taille (132 bp) :

- amorce « sens »: GTCCCACCATGGGGCAAGG

T<sub>m</sub> = 68°C

- amorce « anti-sens » : GTGATGAACCTCAGGATGCTG

T<sub>m</sub> = 64°C

La recherche de mutation a été effectuée à l'aide d'une sonde-Taqman « centrale » spécifique soit de l'allèle sauvage, soit de l'allèle muté, couplée à un fluorophore (6FAM) :

- Sonde *MYD88* sauvage :

[6FAM]CAGAAGCGACTGATCCCCA[TAM] T<sub>m</sub> = 60°C

- Sonde *MYD88* c.794T>C (p.L265P) :

[6FAM]AGAAGCGACCGATCCCCAT[TAM] T<sub>m</sub> = 60°C

Les conditions d'amplification et le programme PCR utilisés classiquement avec les sondes Taqman ont été adaptés pour une amplification optimale des amorces et une fixation optimale des sondes, et sont présentés en **Table 4**.

| Agents               | Concentration finale | Volume, $\mu\text{L}$ |
|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Master Mix           | 1X                   | 10                    |
| H2O                  | NA                   | 6                     |
| Amorce « sens »      | 0,25 $\mu\text{M}$   | 1                     |
| Amorce « anti-sens » | 0,25 $\mu\text{M}$   | 1                     |
| Sonde Taqman         | 0,125 $\mu\text{M}$  | 1                     |
| ADNg                 | 100 ng/ml            | 1                     |
| Conditions de PCR    |                      |                       |
| Dénaturation         | 5min à 95°C          |                       |
| 50 cycles            | 10sec à 95°C         |                       |
|                      | 15sec à 64°C         |                       |
|                      | 25sec à 72°C         |                       |
| Refroidissement      | 30sec à 40°C         |                       |

**Table 4 :** Conditions d'amplification et programme de PCR utilisés pour la détection du statut mutationnel c.794T>C du gène *MYD88*

La calibration de la technique a été effectuée sur dilutions connues en série d'ADN sauvage et muté. Pour chaque plaque 96 puits de PCR, ont été intégrés:

- un contrôle ADN sauvage connu avec sa sonde spécifique Taqman « sauvage »,
- un contrôle ADN sauvage connu avec la sonde Taqman « mutée »,
- un contrôle ADN muté connu avec la sonde Taqman « sauvage »,
- un contrôle ADN muté connu avec sa sonde spécifique Taqman « mutée ».

Un témoin « d'extraction blanc paraffine » et un témoin « eau PCR » avec chaque sonde ont également été compris dans la technique. Chaque échantillon, y compris les témoins, a été analysé deux fois (dupliquas).

## 6. RECUEIL DES DONNEES CLINIQUES :

Les données issues du cahier d'observation du protocole GOELAMS-075 ont été revues et compilées avec le cahier d'observation de cette étude :

- Données cliniques :
  - Numéro d'identification et d'anonymisation
  - Bras de randomisation
  - Au diagnostic : âge, sexe, score ECOG, signes généraux, stade Ann Arbor au diagnostic, atteintes extra-ganglionnaires, bulk (masse $\geq$ 7cm)
  - Calcul des scores aalPI (Index Pronostique International) et R-PI
  - Réponse au traitement : selon les critères révisés de Cheson 2007 intégrant les données cliniques, scannographiques et isotopiques (TEP) à l'évaluation intermédiaire et en fin de traitement
- Données biologiques : LDH
- Données anatomopathologiques :
  - Diagnostic histologique selon la classification OMS 2008 (relecture par l'expert Lymphopath)
  - Détermination du statut GC, NGC, PMBL par IHC soit par relecture des lames initiales, soit par recoupe du bloc inclus en paraffine, saisie des pourcentages d'expression en IHC des protéines CD10, BCL6, MUM1
  - Pourcentage d'expression en IHC des protéines BCL2 et MYC.
- Données de biologie moléculaire :

- Résultats de PCR Taqman *MYD88 L265P*
- Données d'évolution :
  - Date de randomisation
  - Evènement : TEP positive, progression, rechute, décès, nature du décès
  - Date d'évènement
  - Date des dernières nouvelles
  - Etat aux dernières nouvelles

## 7. ANALYSES STATISTIQUES :

### **Critère principal d'évaluation:**

- Survie sans progression à 5 ans : délai entre la randomisation et la progression. La progression était définie par la progression sous traitement, la rechute, le décès toute cause confondue.

### **Critères secondaires d'évaluation :**

- Survie globale à 5 ans : délai entre la randomisation et la survenue du décès toute cause confondue. Pour les patients vivants, la survie globale était censurée à la date des dernières nouvelles.
- Survie sans évènement à 5 ans : délai entre la randomisation et la survenue d'un évènement. L'évènement était défini par l'absence de réponse partielle ou complète à l'évaluation intermédiaire au scanner ou la présence d'un TEP positif à l'évaluation intermédiaire, la progression sous traitement, la rechute, le décès toute cause confondue.

Les variables qualitatives étaient décrites en termes d'effectifs et de pourcentages. Elles étaient comparées par des tests du  $\chi^2$ , ou du  $\chi^2$  corrigé, ou de Fisher exact, selon les valeurs des effectifs attendus sous l'hypothèse d'indépendance (risque  $\alpha$  0,05 et risque  $\beta$  0,2).

L'analyse des données de survie sans progression à 5 ans, de survie globale à 5 ans, de survie sans évènement à 5 ans a été réalisée par la méthode de Kaplan-Meier et par comparaison bilatérale des courbes de survie obtenues par le test du log-rank.

L'analyse principale a été effectuée sur données disponibles, c'est-à-dire sans imputation des données manquantes.

Une analyse univariable sur les facteurs pronostiques de l'étude princeps a été effectuée avec un modèle de Cox.

Les analyses ont été réalisées avec le logiciel SAS® (version n°9.3 et versions ultérieures).

# RESULTATS

Entre 2005 et 2010, 335 patients ont été randomisés dans l'essai clinique GOELAMS-075 : 167 dans le bras RCHOP et 168 dans le bras intensif.

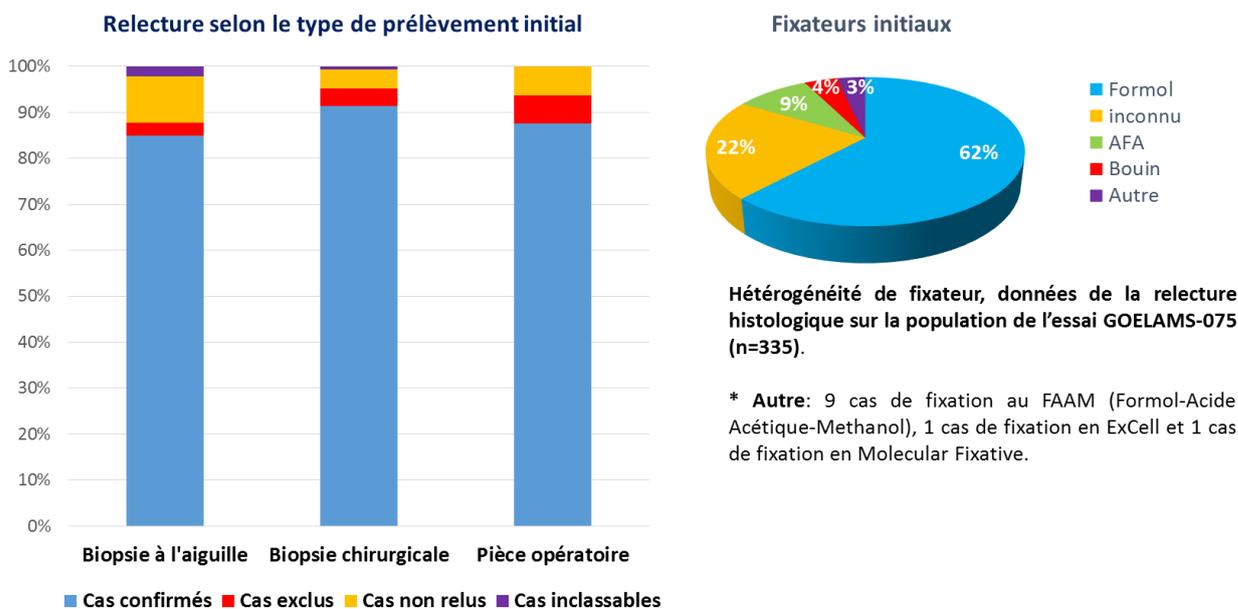
## 1. CONSIDERATIONS PRE-ANALYTIQUES :

A l'issue de la procédure d'appel, 212 blocs de tissu inclus en paraffine ont été reçus. Les lames initiales ont été reçues sans bloc diagnostique pour 46 patients. La construction de TMA a été réalisée pour un total de 120 patients, entre 2009 et 2012 sur la plate-forme du LYSA-P à l'issue d'une première requête de matériel. Des prélèvements histologiques initiaux ont été obtenus pour 66 cas analysés en TMA. Pour 54 cas, les lames TMA étaient le seul matériel disponible. Seuls 23 cas n'ont pu être relus faute de réception ou d'épuisement du matériel histologique initial.

Cent trente-neuf cas de biopsie à l'aiguille (ou drill-biopsie) ont été recensés. Le pourcentage de récupération de matériel était dans cette catégorie de 90%. Il était de 95% pour les 164 cas de biopsie chirurgicale. Lorsque le prélèvement initial provenait d'une pièce opératoire (n=32 cas), le pourcentage de matériel reçu était de 94%.

On observait une hétérogénéité de fixateur importante : 62% de prélèvements fixés en Formol, 9% de prélèvements fixés en AFA, 4% fixés au Bouin, et de façon plus anecdotique 2% fixés au FAAM (Formol - Acide Acétique – Methanol) et 1% fixés en ExCell ou en Molecular Fixative. Dans 22% des cas, le fixateur initial était inconnu (**Figure 4**).

| Disponibilité du matériel |       |       |
|---------------------------|-------|-------|
|                           | TMA + | TMA - |
| Bloc reçu                 | 66    | 146   |
| Bloc non reçu             | 54    | 23    |
| Lames initiales           | 0     | 46    |



**Figure 4 : Considérations pré-analytiques, disponibilité du matériel, type de prélèvement et hétérogénéité de fixateurs**

## 2. RELECTURE CENTRALISEE :

La relecture centralisée des prélèvements diagnostiques a été réalisée pour 312 patients randomisés dans l'essai GOELAMS-075 (93%) : 154 patients randomisés dans le bras RCHOP (92%) et 158 randomisés dans le bras intensif (94%).

La relecture a permis l'exclusion de 12 cas pour lesquels un diagnostic erroné de LBDGC avait été porté :

- dans le bras RCHOP : 3 lymphomes de Burkitt, 2 lymphomes plasmoblastiques, 1 lymphome T de type LAI ;

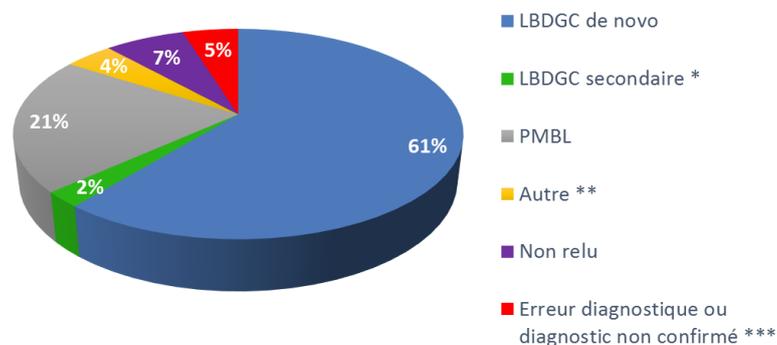
- dans le bras intensif : 3 lymphomes folliculaires, 1 lymphome à cellules du manteau, 1 lymphome gastrique du MALT, 1 carcinome peu différencié.

Quatre cas de lymphome non hodgkinien B agressif inclassable ont été notés, et conservés dans l'analyse finale de l'essai GOELAMS-075 (1 dans le bras RCHOP et 3 dans le bras intensif) mais non inclus dans notre analyse.

Les données de la relecture diagnostique sont présentées en **Figures 5a, 5b et 5c**.

5a

### Relecture histologique



#### Relecture histologique sur la population de l'essai GOELAMS-075 (n=335).

\* **LBDGC secondaire**: découverte concomitante d'un LBDGC et d'un contingent indolent sous-jacent.

\*\* **Autre**: 11 cas de LBDGC de type riche en T et 3 cas de LBDGC CD5+

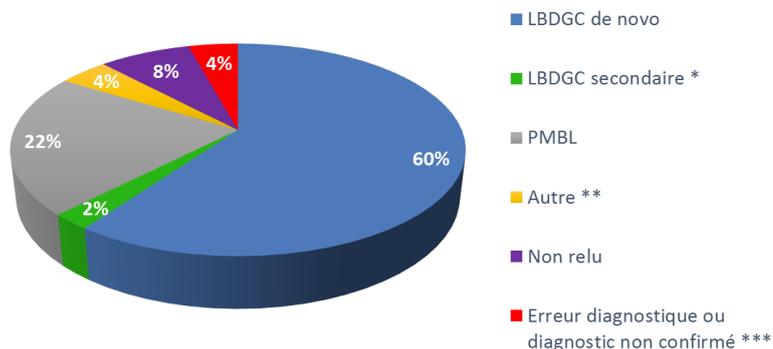
\*\*\* **Erreur diagnostique ou diagnostic non confirmé**: 12 cas retenus d'erreur diagnostique (3 lymphomes de Burkitt, 2 lymphomes plasmablastiques, 3 lymphomes folliculaires, 1 lymphome du MALT gastrique, 1 lymphome du manteau, 1 lymphome T de type LAI, 1 carcinome) et 4 cas de LNH B inclassable.

LBDGC: lymphome B diffus à grandes cellules

PMBL : lymphome B primitif du médiastin

5b

### Relecture histologique bras RCHOP



#### Relecture histologique sur la population du bras RCHOP de l'essai GOELAMS-075 (n=167).

\* **LBDGC secondaire**: découverte concomitante d'un LBDGC et d'un contingent indolent sous-jacent.

\*\* **Autre**: 6 cas de LBDGC de type riche en T et 1 cas de LBDGC CD5+

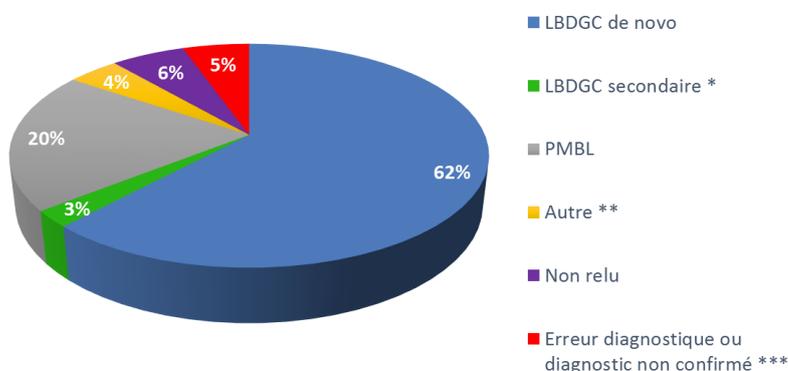
\*\*\* **Erreur diagnostique ou diagnostic non confirmé**: 6 cas retenus d'erreur diagnostique (3 lymphomes de Burkitt, 2 lymphomes plasmablastiques, 1 lymphome T de type LAI) et 1 cas de LNH B inclassable.

LBDGC: lymphome B diffus à grandes cellules

PMBL : lymphome B primitif du médiastin

5c

### Relecture histologique bras intensif



#### Relecture histologique sur la population du bras intensif de l'essai GOELAMS-075 (n=168).

\* **LBDGC secondaire**: découverte concomitante d'un LBDGC et d'un contingent indolent sous-jacent.

\*\* **Autre**: 5 cas de LBDGC de type riche en T et 2 cas de LBDGC CD5+

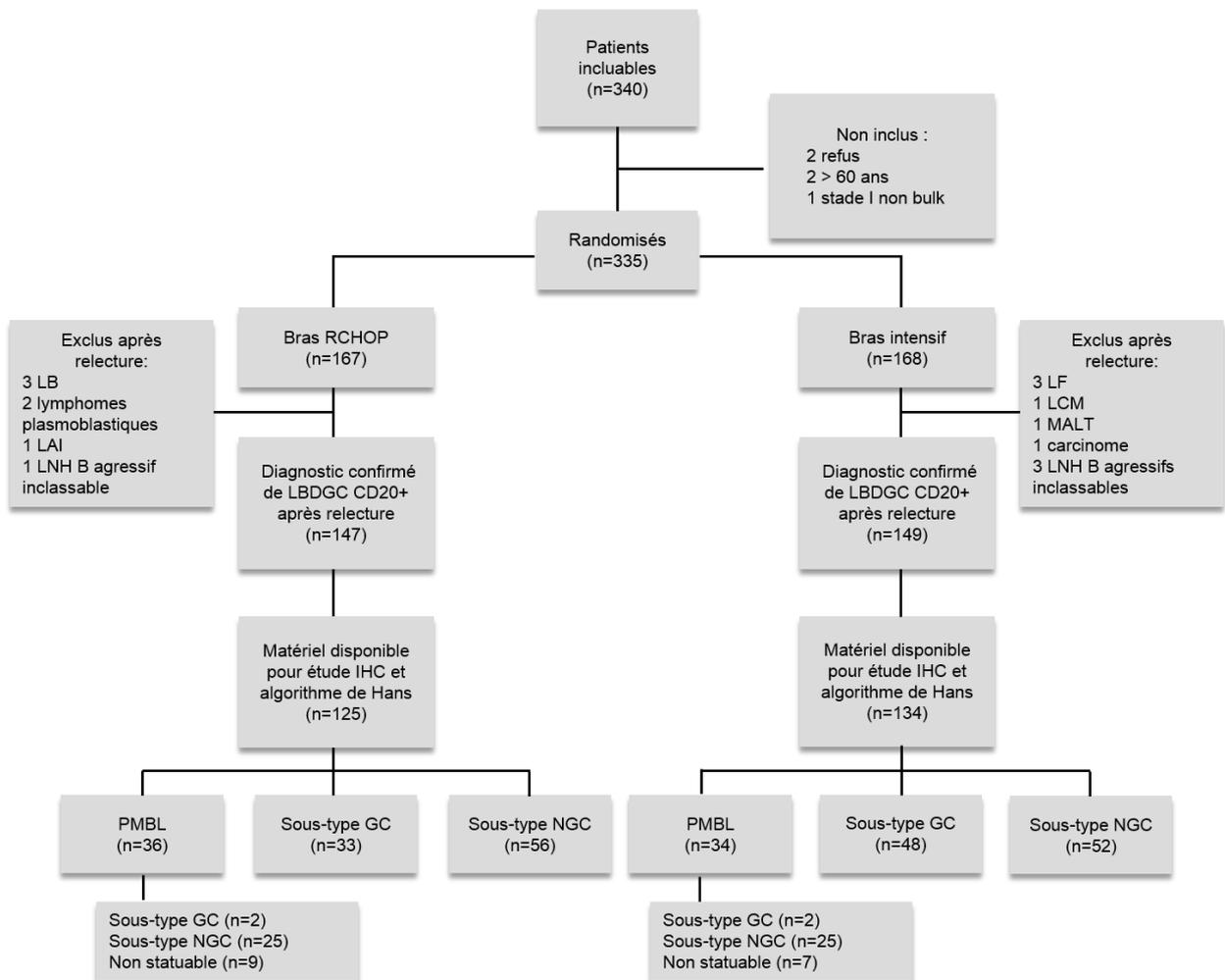
\*\*\* **Erreur diagnostique ou diagnostic non confirmé**: 6 cas retenus d'erreur diagnostique (3 lymphomes folliculaires, 1 lymphome du manteau, 1 lymphome du MALT gastrique, 1 carcinome) et 3 cas de LNH B inclassable.

LBDGC: lymphome B diffus à grandes cellules

PMBL : lymphome B primitif du médiastin

Figures 5a, 5b, 5c : Données de la relecture globale et par bras de traitement

Les étapes de la relecture sont présentées dans la **Figure 6**.



**Figure 6 : Diagramme de flux** décrivant le processus et les résultats de la relecture dans l'essai GOELAMS-075. LAI= lymphome T angio-immunoblastique ; LB= lymphome de Burkitt ; LCM= lymphome à cellules du manteau ; LF= lymphome folliculaire.

Au total, 296 cas de LBDGC CD20+ ont été confirmés (147 dans le bras RCHOP et 149 dans le bras intensif).

Les caractéristiques cliniques au diagnostic pour ces derniers (n=296) étaient superposables aux caractéristiques de l'ensemble de la population analysée dans l'essai GOELAMS-075 (n=323). (**Tableau 1**).

L'âge médian était de 49 ans, une prédominance masculine était notée (60%). Près de deux tiers des cas (n=177/296, 60%) étaient de risque intermédiaire élevé ou élevé selon le score aalPI. Plus de trois quarts des cas étaient de stade III-IV selon la classification Ann Arbor (n=232/296, 78%). L'envahissement médullaire était retrouvé chez 39 patients sur les 288 avec donnée disponible. Parmi ces 39 patients, 2 patients avaient un diagnostic relu de LBDGC avec composant indolent de type lymphome folliculaire de découverte concomitante, 4 patients avaient un diagnostic relu de LBDGC de type B riche en T, et 1 patient avait un diagnostic relu de LBDGC CD5+.

| Caractéristiques               | Tous (n=323) |    | Diagnostic confirmé (n=296) |    | Test du Chi <sup>2</sup><br>p-value |
|--------------------------------|--------------|----|-----------------------------|----|-------------------------------------|
|                                | No.          | %  | No.                         | %  |                                     |
| Age, années                    |              |    |                             |    |                                     |
| 18-49                          | 170/323      | 53 | 155/296                     | 52 | 0,98                                |
| 50-60                          | 153/323      | 47 | 141/296                     | 48 |                                     |
| Age médian                     | 49           |    | 49                          |    |                                     |
| Sexe                           |              |    |                             |    |                                     |
| Masculin                       | 190/323      | 59 | 172/296                     | 60 | 0,92                                |
| aalPI                          |              |    |                             |    |                                     |
| 0-1                            | 124/323      | 38 | 119/296                     | 40 | 0,7                                 |
| 2-3                            | 199/323      | 62 | 177/296                     | 60 |                                     |
| ECOG                           |              |    |                             |    |                                     |
| 2-4                            | 51/323       | 16 | 47/296                      | 16 | 0,94                                |
| LDH                            |              |    |                             |    |                                     |
| Elevées                        | 237/321      | 74 | 218/294                     | 74 | 0,99                                |
| Symptômes B                    | 135/323      | 42 | 121/295                     | 41 | 0,91                                |
| Stade Ann Arbor                |              |    |                             |    |                                     |
| III-IV                         | 253/323      | 78 | 232/296                     | 78 | 0,93                                |
| Envahissement médullaire       |              |    |                             |    |                                     |
| Oui                            | 45/316       | 14 | 39/288                      | 14 | 0,89                                |
| Atteintes extra-ganglionnaires |              |    |                             |    |                                     |
| ≥ 2                            | 126/323      | 39 | 118/296                     | 40 | 0,89                                |
| Bulk                           |              |    |                             |    |                                     |
| ≥ 7 cm                         | 197/316      | 62 | 177/289                     | 61 | 0,85                                |
| Décès                          |              |    |                             |    |                                     |
| Total décès                    | 56/323       | 17 | 54/296                      | 18 | 0,85                                |
| Décès liés à la maladie        | 35/56        | 63 | 35/54                       | 65 |                                     |
| Décès toxiques                 | 13/56        | 23 | 13/54                       | 24 | 0,91                                |
| Autre cause                    | 8/56         | 14 | 6/54                        | 11 | 0,83                                |

**Tableau 1** : Caractéristiques cliniques de l'intégralité de la population de l'essai GOELAMS-075 (n=323) et des cas avec confirmation diagnostique de LBDGC (n=296).

Les caractéristiques cliniques étaient comparables dans les deux bras de traitement pour les 296 cas confirmés de LBDGC, excepté pour le score ECOG qui apparaissait significativement plus élevé dans le bras intensif (p=0,01). (Tableau 2)

**Tableau 2 : Caractéristiques cliniques en fonction du bras de traitement dans la population d'étude (n=296).**

| LBDGC diagnostic confirmé (n=296) |   |    |  |    |                                     |
|-----------------------------------|---|----|--|----|-------------------------------------|
| Caractéristiques                  | Bras RCHOP (n=147)                                    |    | Bras intensif (n=149)  |    | Test du Chi <sup>2</sup><br>p-value |
|                                   | No.   | %  | No.  | %  |                                     |
| Age, années                       |   |    |  |    |                                     |
| 18-49                             | 77/147  | 52 | 78/149   | 52 | 0,91                                |
| 50-60                             | 70/147  | 48 | 71/149   | 48 |                                     |
| Age médian                        | 48  |    | 49   |    |                                     |
| Sexe                              |   |    |  |    |                                     |
| Masculin                          | 77/147  | 52 | 95/149   | 64 | 0,06                                |
| aaIPI                             |   |    |  |    |                                     |
| 0-1                               | 63/147  | 43 | 56/149   | 38 | 0,42                                |
| 2-3                               | 84/147  | 57 | 93/149   | 62 |                                     |
| ECOG                              |   |    |  |    |                                     |
| 2-4                               | 15/147  | 10 | 32/149   | 21 | 0,01                                |
| LDH                               |   |    |  |    |                                     |
| Elevées                           | 105/147   | 71 | 113/147  | 77 | 0,35                                |
| Symptômes B                       | 61/146  | 42 | 60/149   | 40 | 0,88                                |
| Stade Ann Arbor                   |   |    |  |    |                                     |
| III-IV                            | 116/147   | 79 | 116/149  | 78 | 0,94                                |
| Envahissement médullaire          |   |    |  |    |                                     |
| Oui                               | 22/143  | 15 | 17/145   | 12 | 0,54                                |
| Atteintes extra-ganglionnaires    |   |    |  |    |                                     |
| ≥ 2                               | 57/147  | 39 | 61/149   | 41 | 0,79                                |
| Bulk                              |   |    |  |    |                                     |
| ≥ 7 cm                            | 88/144  | 61 | 89/145   | 61 | 0,94                                |
| Sous-type COO (IHC)               |   |    |  |    |                                     |
| PMBL                              | 36/125  | 29 | 34/134   | 25 | 0,63                                |
| GC                                | 33/125  | 27 | 48/134   | 36 | 0,21                                |
| NGC                               | 56/125  | 45 | 52/134   | 39 | 0,39                                |
| Décès                             |   |    |  |    |                                     |
| Total décès                       | 25/147  | 17 | 29/149   | 19 | 0,69                                |
| Décès liés à la maladie           | 17/25   | 68 | 18/29  | 62 | 0,87                                |
| Décès toxiques                    | 6/25  | 24 | 7/29   | 24 | 0,76                                |
| Autre cause                       | 2/25<br>- Insuffisance respiratoire<br>- Non expliqué | 8  | 4/29<br>- Autre cancer: 2<br>- Infection tardive: 1<br>- non expliqué: 1 | 14 | 0,81                                |

### 3. DETERMINATION DE LA COO :

La détermination de la COO a été effective pour 125/147 cas confirmés dans le bras RCHOP (85%) et pour 134/149 cas confirmés dans le bras intensif (90%), soit 259/296 cas confirmés au total (87,5%). La répartition des différents sous-types était la suivante : 33/125 (26%) GC, 56/125 (45%) NGC, 36/125 (29%) PMBL dans le bras RCHOP ; 48/134 (36%) GC, 52/134 (39%) NGC, 34/134 (25%) PMBL dans le bras intensif. Cette répartition était comparable dans les deux bras de traitement ( $p= 0,26$ ).

De façon générale, on notait 31% de GC, 42% de NGC et 27% de PMBL dans l'ensemble de la population étudiée ( $n=259$ ). Le sous-type PMBL était dans la grande majorité des cas de phénotype NGC (**Figure 6** et **Tableau 2**).

Les données cliniques au diagnostic dans chaque sous-type étaient comparables dans les deux bras de randomisation, à l'exception du nombre d'atteinte extraganglionnaire  $\geq 2$  dans le sous-type PMBL, plus fréquemment retrouvée dans le bras RCHOP (22% vs 3% dans le bras intensif,  $p=0,03$ ) (**Tableau 3**, **Tableau 4**, **Tableau 5**).

**Tableau 3 : Caractéristiques cliniques du sous-type GC (n=81) et répartition selon le bras de traitement**

| Caractéristiques               | Sous-type GC |    |                   |    |   |    | Test du Chi <sup>2</sup><br>p-value |
|--------------------------------|--------------|----|-------------------|----|---|----|-------------------------------------|
|                                | Tous (n=81)  |    | Bras RCHOP (n=33) |    | Bras intensif (n=48)                              |    |                                     |
|                                | No.          | %  | No.               | %  | No.   | %  |                                     |
| Age, années                    |              |    |                   |    |   |    |                                     |
| 18-49                          | 37/81        | 46 | 17/33             | 52 | 20/48   | 42 | 0,52                                |
| 50-60                          | 44/81        | 54 | 16/33             | 48 | 28/48   | 58 |                                     |
| Age médian                     | 50           |    | 50                |    | 51  |    |                                     |
| Sexe                           |              |    |                   |    |   |    |                                     |
| Masculin                       | 52/81        | 64 | 17/33             | 52 | 35/48   | 73 | 0,08                                |
| aaIPI                          |              |    |                   |    |   |    |                                     |
| 0-1                            | 31/81        | 38 | 14/33             | 42 | 17/48   | 35 | 0,48                                |
| 2-3                            | 50/81        | 62 | 19/33             | 58 | 31/48   | 65 |                                     |
| ECOG                           |              |    |                   |    |   |    |                                     |
| 2-4                            | 10/81        | 12 | 3/33              | 9  | 7/48  | 15 | 0,51                                |
| LDH                            |              |    |                   |    |   |    |                                     |
| Elevées                        | 53/80        | 66 | 21/33             | 64 | 32/47   | 68 | 0,86                                |
| Symptômes B                    | 22/81        | 27 | 11/33             | 33 | 11/48   | 23 | 0,43                                |
| Stade Ann Arbor                |              |    |                   |    |   |    |                                     |
| III-IV                         | 71/81        | 88 | 29/33             | 88 | 42/48   | 88 | 0,77                                |
| Envahissement médullaire       |              |    |                   |    |   |    |                                     |
| Oui                            | 15/78        | 19 | 6/31              | 19 | 9/47  | 19 | 0,82                                |
| Atteintes extra-ganglionnaires |              |    |                   |    |   |    |                                     |
| ≥ 2                            | 29/81        | 36 | 13/33             | 39 | 16/48   | 33 | 0,75                                |
| Bulk                           |              |    |                   |    |   |    |                                     |
| ≥ 7 cm                         | 51/80        | 64 | 19/32             | 59 | 32/48   | 67 | 0,67                                |
| Décès                          |              |    |                   |    |   |    |                                     |
| Total décès                    | 20/81        | 25 | 7/33              | 21 | 13/48   | 27 | 0,73                                |
| Décès liés à la maladie        | 12/20        | 60 | 4/7               | 57 | 8/13  | 62 | 0,99                                |
| Décès toxiques                 | 5/20         | 25 | 3/7               | 43 | 2/13  | 15 | 0,29                                |
| Autre cause                    | 3/20         | 15 | 0/7               |    | 3/13<br>-Autre cancer: 2<br>-Infection tardive: 1 | 23 | 0,52                                |

**Tableau 4 Caractéristiques cliniques du sous-type NGC (n=108) et répartition selon le bras de traitement**

| Caractéristiques               | Sous-type NGC |    |   |    |                              |    | Test du Chi <sup>2</sup><br>p-value |
|--------------------------------|---------------|----|---|----|------------------------------|----|-------------------------------------|
|                                | Tous (n=108)  |    | Bras RCHOP (n=56)   |    | Bras intensif (n=52)         |    |                                     |
|                                | No.           | %  | No.   | %  | No.                          | %  |                                     |
| Age, années                    |               |    |   |    |                              |    |                                     |
| 18-49                          | 45/108        | 42 | 25/56   | 45 | 20/52                        | 38 | 0,65                                |
| 50-60                          | 63/108        | 58 | 31/56   | 55 | 32/52                        | 62 |                                     |
| Age médian                     | 49            |    | 47  |    | 48                           |    |                                     |
| Sexe                           |               |    |   |    |                              |    |                                     |
| Masculin                       | 67/108        | 62 | 33/56   | 59 | 34/52                        | 65 | 0,62                                |
| aaIPI                          |               |    |   |    |                              |    |                                     |
| 0-1                            | 34/108        | 31 | 22/56   | 39 | 12/52                        | 23 | 0,11                                |
| 2-3                            | 74/108        | 69 | 34/56   | 61 | 40/52                        | 77 |                                     |
| ECOG                           |               |    |   |    |                              |    |                                     |
| 2-4                            | 22/108        | 20 | 8/56  | 14 | 14/52                        | 27 | 0,19                                |
| LDH                            |               |    |   |    |                              |    |                                     |
| Elevées                        | 80/107        | 75 | 39/56   | 70 | 41/51                        | 80 | 0,29                                |
| Symptômes B                    | 53/108        | 49 | 25/56   | 45 | 28/52                        | 54 | 0,55                                |
| Stade Ann Arbor                |               |    |   |    |                              |    |                                     |
| III-IV                         | 95/108        | 88 | 48/56   | 86 | 47/52                        | 90 | 0,65                                |
| Envahissement médullaire       |               |    |   |    |                              |    |                                     |
| Oui                            | 19/107        | 18 | 8/56  | 14 | 11/51                        | 22 | 0,46                                |
| Atteintes extra-ganglionnaires |               |    |   |    |                              |    |                                     |
| ≥ 2                            | 52/108        | 48 | 22/56   | 39 | 30/52                        | 58 | 0,08                                |
| Bulk                           |               |    |   |    |                              |    |                                     |
| ≥ 7 cm                         | 41/103        | 40 | 22/55   | 40 | 19/48                        | 40 | 0,87                                |
| Décès                          |               |    |   |    |                              |    |                                     |
| Total décès                    | 24/108        | 22 | 12/56   | 21 | 12/52                        | 23 | 0,98                                |
| Décès liés à la maladie        | 16/24         | 67 | 9/12  | 75 | 7/12                         | 58 | 0,66                                |
| Décès toxiques                 | 5/24          | 21 | 1/12  | 8  | 4/12                         | 33 | 0,32                                |
| Autre cause                    | 3/24          | 12 | 2/12<br>-Insuffisance<br>respiratoire<br>-Décès<br>inexpliqué | 17 | 1/12<br>-Décès<br>inexpliqué | 9  | 0,99                                |

**Tableau 5 : Caractéristiques cliniques du sous-type GC (n=70) et répartition selon le bras de traitement**

| Caractéristiques                      | PMBL        |     |                   |     |                      |     | Test du Chi <sup>2</sup><br>p-value |
|---------------------------------------|-------------|-----|-------------------|-----|----------------------|-----|-------------------------------------|
|                                       | Tous (n=70) |     | Bras RCHOP (n=36) |     | Bras intensif (n=34) |     |                                     |
|                                       | No.         | %   | No.               | %   | No.                  | %   |                                     |
| <b>Age, années</b>                    |             |     |                   |     |                      |     |                                     |
| 18-49                                 | 61/70       | 87  | 30/36             | 83  | 31/34                | 91  | 0,47                                |
| 50-60                                 | 9/70        | 13  | 6/36              | 17  | 3/34                 | 9   |                                     |
| Age médian                            | 38          |     | 38                |     | 38                   |     |                                     |
| <b>Sexe</b>                           |             |     |                   |     |                      |     |                                     |
| Masculin                              | 30/70       | 43  | 14/36             | 39  | 16/34                | 47  | 0,65                                |
| <b>aaPI</b>                           |             |     |                   |     |                      |     |                                     |
| 0-1                                   | 38/70       | 54  | 18/36             | 50  | 20/34                | 59  | 0,61                                |
| 2-3                                   | 32/70       | 46  | 18/36             | 50  | 14/34                | 41  |                                     |
| <b>ECOG</b>                           |             |     |                   |     |                      |     |                                     |
| 2-4                                   | 9/70        | 13  | 2/36              | 6   | 7/34                 | 20  | 0,08                                |
| <b>LDH</b>                            |             |     |                   |     |                      |     |                                     |
| Elevées                               | 58/70       | 83  | 30/36             | 83  | 28/34                | 82  | 0,83                                |
| Symptômes B                           | 19/70       | 27  | 16/36             | 44  | 13/34                | 38  | 0,77                                |
| <b>Stade Ann Arbor</b>                |             |     |                   |     |                      |     |                                     |
| III-IV                                | 31/70       | 44  | 19/36             | 53  | 12/34                | 35  | 0,22                                |
| <b>Envahissement médullaire</b>       |             |     |                   |     |                      |     |                                     |
| Oui                                   | 0/69        | 0   | 0/35              | 0   | 0/34                 | 0   | ns                                  |
| <b>Atteintes extra-ganglionnaires</b> |             |     |                   |     |                      |     |                                     |
| ≥ 2                                   | 9/70        | 13  | 8/36              | 22  | 1/34                 | 3   | 0,03                                |
| <b>Bulk</b>                           |             |     |                   |     |                      |     |                                     |
| ≥ 7 cm                                | 70/70       | 100 | 36/36             | 100 | 34/34                | 100 | ns                                  |
| <b>Décès</b>                          |             |     |                   |     |                      |     |                                     |
| Total décès                           | 3/70        | 4   | 2/36              | 5   | 1/34                 | 3   | 0,99                                |
| Décès liés à la maladie               | 3/3         | 100 | 2/2               | 100 | 1/1                  | 100 | ns                                  |
| <b>Décès toxiques</b>                 |             |     |                   |     |                      |     |                                     |
| <b>Autre cause</b>                    |             |     |                   |     |                      |     |                                     |

Les caractéristiques cliniques des sous-types GC et NGC étaient comparables à l'exception de la présence de symptômes B plus fréquente dans le sous-type NGC (49% *versus* 27% dans le sous-type GC,  $p=0,003$ ) et de la présence d'une forte masse tumorale  $\geq 7$ cm plus fréquente dans le sous-type GC (64% *versus* 40% dans le sous-type NGC,  $p=0,002$ ) (**Tableau 6**).

Le sous-type PMBL affichait un âge médian de 38 ans (contre 50 et 49 ans respectivement dans les sous-types GC et NGC), une prédominance féminine (57%, *versus* 36% et 38% dans les sous-types GC et NGC,  $p=0,01$ ), une prédominance de stades I-II Ann Arbor avec forte masse tumorale (66% *versus* 12% dans les sous-types GC et NGC,  $p < 0,0001$ ), un score aalPI plus faible (0-1) pour 54% des cas (*versus* 38% et 32% dans les sous-types GC et NGC respectivement,  $p=0,009$ ). L'envahissement médullaire n'était pas retrouvé dans le sous-type PMBL (0% *versus* 19% et 18% dans les sous-types GC et NGC,  $p=0,0006$ ).

**Tableau 6** : Comparaison des caractéristiques cliniques entre les différents sous-types de COO

| Caractéristiques                      | Sous-type GC |    | Sous-type NGC |    | PMBL        |     | Test du Chi <sup>2</sup><br>p-value | Test du Chi <sup>2</sup><br>p-value |
|---------------------------------------|--------------|----|---------------|----|-------------|-----|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                                       | Tous (n=81)  |    | Tous (n=108)  |    | Tous (n=70) |     | Comparaison GC-NGC                  | Comparaison des trois sous-types    |
|                                       | No.          | %  | No.           | %  | No.         | %   |                                     |                                     |
| <b>Age, années</b>                    |              |    |               |    |             |     |                                     |                                     |
| 18-49                                 | 37/81        | 46 | 45/108        | 42 | 61/70       | 87  | 0,68                                | < 0,0001                            |
| 50-60                                 | 44/81        | 54 | 63/108        | 58 | 9/70        | 13  |                                     |                                     |
| Age médian                            | 50           |    | 49            |    | 38          |     |                                     |                                     |
| <b>Sexe</b>                           |              |    |               |    |             |     |                                     |                                     |
| Masculin                              | 52/81        | 64 | 67/108        | 62 | 30/70       | 43  | 0,87                                | 0,01                                |
| <b>aalPI</b>                          |              |    |               |    |             |     |                                     |                                     |
| 0-1                                   | 31/81        | 38 | 34/108        | 31 | 38/70       | 54  | 0,41                                | 0,009                               |
| 2-3                                   | 50/81        | 62 | 74/108        | 69 | 32/70       | 46  |                                     |                                     |
| <b>ECOG</b>                           |              |    |               |    |             |     |                                     |                                     |
| 2-4                                   | 10/81        | 12 | 22/108        | 20 | 9/70        | 13  | 0,21                                | 0,24                                |
| <b>LDH</b>                            |              |    |               |    |             |     |                                     |                                     |
| Elevées                               | 53/80        | 66 | 80/107        | 75 | 58/70       | 83  | 0,27                                | 0,06                                |
| Symptômes B                           | 22/81        | 27 | 53/108        | 49 | 19/70       | 27  | 0,003                               | 0,001                               |
| <b>Stade Ann Arbor</b>                |              |    |               |    |             |     |                                     |                                     |
| III-IV                                | 71/81        | 88 | 95/108        | 88 | 31/70       | 44  | 0,87                                | < 0,0001                            |
| <b>Envahissement médullaire</b>       |              |    |               |    |             |     |                                     |                                     |
| Oui                                   | 15/78        | 19 | 19/107        | 18 | 0/69        | 0   | 0,95                                | 0,0006                              |
| <b>Atteintes extra-ganglionnaires</b> |              |    |               |    |             |     |                                     |                                     |
| ≥ 2                                   | 29/81        | 36 | 52/108        | 48 | 9/70        | 13  | 0,12                                | < 0,0001                            |
| <b>Bulk</b>                           |              |    |               |    |             |     |                                     |                                     |
| ≥ 7 cm                                | 51/80        | 64 | 41/103        | 40 | 70/70       | 100 | 0,002                               | <0,0001                             |
| <b>Décès</b>                          |              |    |               |    |             |     |                                     |                                     |
| Total décès                           | 20/81        | 25 | 24/108        | 22 | 3/70        | 4   | 0,82                                | 0,0005                              |
| Décès liés à la maladie               | 12/20        | 60 | 16/24         | 67 | 3/3         | 100 | 0,88                                | 0,63                                |
| Décès toxiques                        | 5/20         | 25 | 5/24          | 21 |             |     | 0,97                                | ns                                  |
| Autre cause                           | 3/20         | 15 | 3/24          | 12 |             |     | 0,99                                | ns                                  |

## 4. EXPRESSION PROTEIQUE DE BCL2 ET

### MYC :

L'expression de BCL2 en IHC a été évaluée pour 268 cas exploitables sur les 296 cas de LBDGC confirmés (90%) : 131 cas dans le bras RCHOP (sur 147 cas, 89%) et 137 cas dans le bras intensif (sur 149 cas, 92%). Un pourcentage d'expression de BCL2 médian de 80% sur l'ensemble des 268 patients analysés était relevé (0%-100%). Il était de 70% dans chacun des deux bras de traitement (0%-100% dans les deux bras). Dans la population analysée (n=268), 65% des cas exprimaient BCL2  $\geq$ 50% et 55% des cas BCL2  $\geq$ 70%, sans différence entre les deux bras de traitement.

L'expression de MYC en IHC a été déterminée pour 185 cas exploitables sur les 296 cas de LBDGC confirmés (63%) : 93 cas dans le bras RCHOP (sur 147 cas, 63%) et 92 cas dans le bras intensif (sur 149 cas, 62%). Un pourcentage d'expression médian de 30% était retrouvé dans la population analysée des 185 cas exploitables. Il était également de 30% dans chacun des deux bras de traitement (0%-100% dans le bras RCHOP et 0%-90% dans le bras intensif). La surexpression de MYC  $\geq$ 40% était retrouvée dans 86/185 cas (46%), soit 43/93 cas dans le bras RCHOP (46%) et 43/92 cas dans le bras intensif (47%).

Un tiers des patients avec des données disponibles pour BCL2 et MYC coexprimait ces deux protéines (59/184, 32%) avec des seuils de positivité retenus de 50% pour BCL2 et 40% pour MYC. Lorsque le seuil de positivité de BCL2 à 70% était retenu, 52/184 cas (28%) présentaient une coexpression de BCL2 et MYC. Ces proportions étaient comparables dans les deux bras de traitement (**Tableau 7**).

**Tableau 7 : Données d'expression protéique de BCL2 et MYC en fonction du bras de traitement**

| Caractéristiques                              | LBDGC confirmés (n=296) |    | Bras RCHOP (n=147) |    | Bras intensif (n=149) |    | Test du Chi <sup>2</sup> p-value |
|---|-------------------------|----|--------------------|----|-----------------------|----|----------------------------------|
|   | No.                     | %  | No.                | %  | No.                   | %  |                                  |
| Expression protéine BCL2 (IHC)                |                         |    |                    |    |                       |    |                                  |
| ≥ 50%   | 175/268                 | 65 | 86/131             | 66 | 89/137                | 65 | 0,99                             |
| ≥ 70%   | 147/268                 | 55 | 72/131             | 55 | 75/137                | 55 | 0,93                             |
| Expression protéine MYC (IHC)                 |                         |    |                    |    |                       |    |                                  |
| ≥ 40%   | 86/185                  | 46 | 43/93              | 46 | 43/92                 | 47 | 0,94                             |
| Coexpression protéines MYC-BCL2 (≥ 50%) (IHC) | 59/184                  | 32 | 31/93              | 33 | 28/91                 | 31 | 0,83                             |
| Coexpression protéines MYC-BCL2 (≥ 70%) (IHC) | 52/184                  | 28 | 26/93              | 28 | 26/91                 | 29 | 0,94                             |

L'expression de la protéine BCL2  $\geq 50\%$  et  $\geq 70\%$  était notée dans 68% et 60% des cas de LBDGC de type GC, dans 74% et 66% des cas de LBDGC NGC et dans une proportion significativement inférieure de 50% et 34% des cas de PMBL ( $p=0,006$  et  $p=0,0002$ ). De la même manière, l'expression de la protéine MYC  $\geq 40\%$  était plus fréquemment retrouvée dans les sous-types GC et NGC (53% et 57% respectivement,  $p=0,81$ ), contre 17% dans le sous-type PMBL ( $p=0,0002$ ). La coexpression des protéines BCL2  $\geq 70\%$  et MYC  $\geq 40\%$  était observée dans une proportion équivalente de LBDGC de type GC et de LBDGC de type NGC (30% et 35% respectivement,  $p=0,59$ ). A l'inverse, cette coexpression n'était que rarement observée dans les cas de PMBL (1/49,  $p<0,0001$ ) (**Tableau 8**).

La répartition des cas surexprimant BCL2, MYC ou les deux au sein des sous-types GC, NGC et PMBL était homogène entre les deux bras de traitement (**Tableau 9**).

**Tableau 8 : Données d'expression protéique de BCL2 et MYC en fonction du sous-type COO**

| Caractéristiques                                     | Sous-type GC |    | Sous-type NGC |    | PMBL        |    | Test du Chi <sup>2</sup><br>p-value | Test du Chi <sup>2</sup><br>p-value    |
|--|--------------|----|---------------|----|-------------|----|-------------------------------------|--|
|  | Tous (n=81)  |    | Tous (n=108)  |    | Tous (n=70) |    | Comparaison<br>GC-NGC               | Comparaison<br>des trois<br>sous-types |
|  | No.          | %  | No.           | %  | No.         | %  |                                     |  |
| Expression protéine BCL2 (IHC)                       |              |    |               |    |             |    |                                     |  |
| ≥ 50%  | 54/80        | 68 | 78/105        | 74 | 31/62       | 50 | 0,39                                | 0,006                                  |
| ≥ 70%  | 48/80        | 60 | 69/105        | 66 | 21/62       | 34 | 0,52                                | 0,0002                                 |
| Expression protéine MYC (IHC)                        |              |    |               |    |             |    |                                     |  |
| ≥ 40%  | 33/62        | 53 | 47/83         | 57 | 6/35        | 17 | 0,81                                | 0,0002                                 |
| Coexpression<br>protéines MYC-<br>BCL2 (≥ 50%) (IHC) | 20/66        | 30 | 37/89         | 42 | 2/49        | 4  | 0,20                                | < 0,0001                               |
| Coexpression<br>protéines MYC-<br>BCL2 (≥ 70%) (IHC) | 20/67        | 30 | 32/91         | 35 | 1/49        | 2  | 0,59                                | < 0,0001                               |

**Tableau 9 : Données d'expression protéique de BCL2 et MYC en fonction du sous-type COO et du bras de traitement.**

| Caractéristiques                              | Sous-type GC |    |                   |    |                      |    | Test du Chi <sup>2</sup><br>p-value |
|---|--------------|----|-------------------|----|----------------------|----|-------------------------------------|
|   | Tous (n=81)  |    | Bras RCHOP (n=33) |    | Bras intensif (n=48) |    |                                     |
|   | No.          | %  | No.               | %  | No.                  | %  |                                     |
| Expression protéine BCL2 (IHC)                |              |    |                   |    |                      |    |                                     |
| ≥ 50%   | 54/80        | 68 | 21/33             | 64 | 33/47                | 70 | 0,70                                |
| ≥ 70%   | 48/80        | 60 | 17/33             | 52 | 31/47                | 66 | 0,28                                |
| Expression protéine MYC (IHC)                 |              |    |                   |    |                      |    |                                     |
| ≥ 40%   | 33/62        | 53 | 16/28             | 57 | 17/34                | 50 | 0,76                                |
| Coexpression protéines MYC-BCL2 (≥ 50%) (IHC) | 20/66        | 30 | 9/29              | 31 | 11/37                | 30 | 0,87                                |
| Coexpression protéines MYC-BCL2 (≥ 70%) (IHC) | 20/67        | 30 | 8/30              | 27 | 11/37                | 30 | 0,99                                |

| Caractéristiques                              | Sous-type NGC |    |                   |    |                      |    | Test du Chi <sup>2</sup><br>p-value |
|---|---------------|----|-------------------|----|----------------------|----|-------------------------------------|
|   | Tous (n=108)  |    | Bras RCHOP (n=56) |    | Bras intensif (n=52) |    |                                     |
|   | No.           | %  | No.               | %  | No.                  | %  |                                     |
| Expression protéine BCL2 (IHC)                |               |    |                   |    |                      |    |                                     |
| ≥ 50%   | 78/105        | 74 | 43/56             | 77 | 35/49                | 71 | 0,69                                |
| ≥ 70%   | 69/105        | 66 | 38/56             | 68 | 31/49                | 63 | 0,77                                |
| Expression protéine MYC (IHC)                 |               |    |                   |    |                      |    |                                     |
| ≥ 40%   | 47/83         | 57 | 26/45             | 58 | 21/38                | 55 | 0,99                                |
| Coexpression protéines MYC-BCL2 (≥ 50%) (IHC) | 37/89         | 42 | 22/49             | 45 | 15/40                | 38 | 0,62                                |
| Coexpression protéines MYC-BCL2 (≥ 70%) (IHC) | 32/91         | 35 | 18/50             | 36 | 14/41                | 34 | 0,97                                |

| Caractéristiques                              | PMBL        |    |                   |    |                      |    | Test du Chi <sup>2</sup><br>p-value |
|---|-------------|----|-------------------|----|----------------------|----|-------------------------------------|
|   | Tous (n=70) |    | Bras RCHOP (n=36) |    | Bras intensif (n=34) |    |                                     |
|   | No.         | %  | No.               | %  | No.                  | %  |                                     |
| Expression protéine BCL2 (IHC)                |             |    |                   |    |                      |    |                                     |
| ≥ 50%   | 31/62       | 50 | 15/31             | 48 | 16/31                | 52 | 0,99                                |
| ≥ 70%   | 21/62       | 34 | 11/31             | 35 | 10/31                | 32 | 0,99                                |
| Expression protéine MYC (IHC)                 |             |    |                   |    |                      |    |                                     |
| ≥ 40%   | 6/35        | 17 | 1/18              | 6  | 5/17                 | 29 | 0,09                                |
| Coexpression protéines MYC-BCL2 (≥ 50%) (IHC) | 2/49        | 4  | 0/24              | 0  | 2/25                 | 8  | 0,49                                |
| Coexpression protéines MYC-BCL2 (≥ 70%) (IHC) | 1/49        | 2  | 0/24              | 0  | 1/25                 | 4  | 0,99                                |

## 5. IMPACT DE LA COO SUR LA SURVIE :

Le suivi médian de la population d'étude des 296 cas de LBDGC confirmés était de 71 mois, identique à celui des 323 patients analysés dans l'essai GOELAMS-075. Il était de 72 mois pour les 259 cas statués pour la cellule d'origine. Pour les données de PFS et d'EFS, les analyses ont été réalisées à partir de 294 patients (2 patients dans le bras intensif avec données manquantes, sortis d'essai précocement pour toxicité). Dans la population du GOELAMS-075, les données de PFS et d'EFS étaient disponibles pour 320 patients (3 patients dans le bras intensif avec données manquantes, sortis d'essai précocement pour toxicité). Les données de survie globale ont en revanche été analysées sur l'ensemble des effectifs.

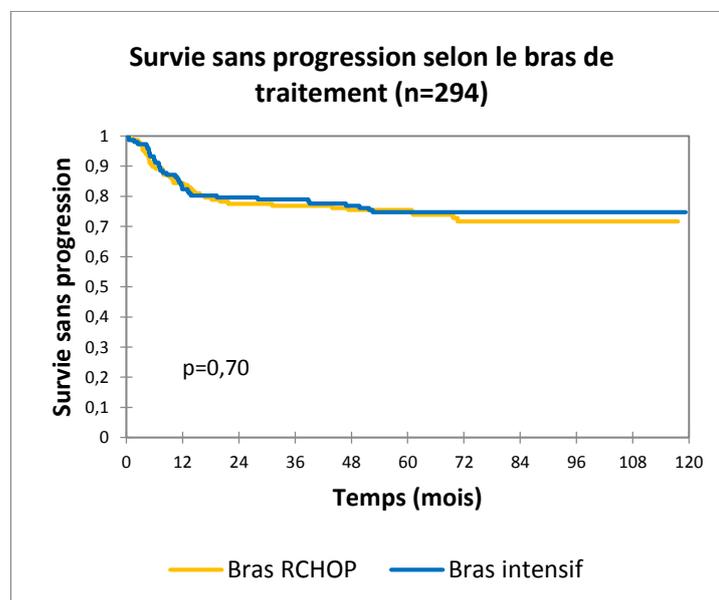
### 5.1. SURVIE SANS PROGRESSION :

A 5 ans, la PFS était de 75%  $\pm$  4%, identique dans les deux bras de traitement dans la population d'étude (n=294) (**Figure 7**). Ces résultats étaient similaires à ceux obtenus pour les 320 patients analysés dans l'essai GOELAMS-075 (76%  $\pm$  3 dans le bras RCHOP et 75%  $\pm$  4% dans le bras intensif ; p=0,82). Il était observé 40 évènements dans le bras RCHOP dont 18 progressions avec un délai médian de progression de 1,9 mois (0,6-6,3), 17 rechutes avec un délai médian de rechute de 14,6 mois (7,7-70) et 5 décès (comme premier évènement).

Dans le bras intensif, 37 évènements étaient notés dont 16 progressions avec un délai médian de progression de 2,2 mois (0,5-2,8), 12 rechutes avec un délai médian de rechute de 11,7 mois (4,4-46,8) et 9 décès (comme premier évènement).

La PFS était sous l'influence de paramètres cliniques équivalents dans la population d'étude et dans l'essai GOELAMS-075 en analyse univariée : l'envahissement médullaire (HR=3,8 ; IC95% [2,3-6,2] p<0,0001), le score aaIPI intermédiaire élevé (HR=2,4 ; IC95% [1,3-4,2] p=0,003), le score aaIPI élevé

(HR=3,7 ; IC95% [1,8-7,4] p=0,0002), la TEP intermédiaire positive (HR=2,06 ; IC95% [1,3-3,3] p=0,003).



**Figure 7** : Survie sans progression dans la population de LBDGC diagnostic confirmé avec donnée disponible (n=294) en fonction du bras de traitement.

La PFS à 5 ans était de 67% ± 5% pour le sous-type GC, de 73% ± 4% pour le sous-type NGC, et de 88% ± 4% pour le sous-type PMBL (HR PMBL=0,3 ; IC95% [0,14-0,71] p=0,01). La médiane n'était pas atteinte (**Figure 8**).

Onze cas de progression (4 dans le bras RCHOP et 7 dans le bras intensif) et 8 rechutes (5 dans le bras RCHOP et 3 dans le bras intensif) étaient rapportés dans le sous-type GC ; dans le sous-type NGC 9 cas de progression (5 dans le bras RCHOP et 4 dans le bras intensif) et 14 cas de rechutes (7 dans le bras RCHOP et 7 dans le bras intensif) étaient observés. Six cas de progression (4 dans le bras RCHOP et 2 dans le bras intensif) et 2 rechutes exclusivement dans le bras RCHOP étaient notés (**Table 5** et **Figure 15**, **Figure 16**, **Figure 17**).

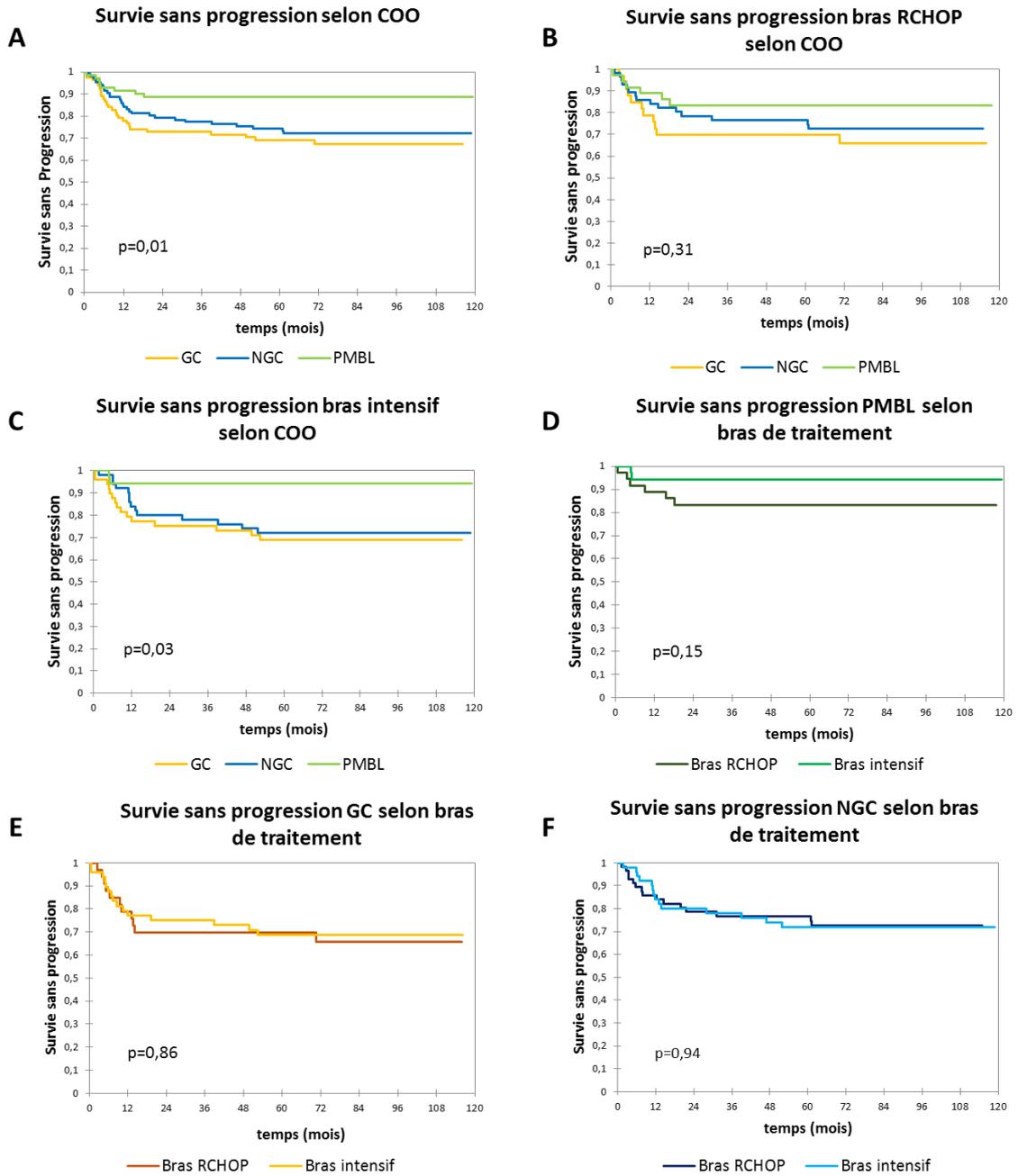
|                      | GC (n=81)       | NGC (n=108)     | PMBL (n=70)   |
|----------------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Progression          | 11 (13%)        | 9 (8%)          | 6 (8%)        |
| Délai médian en mois | 2,2 (0,5-6,3)   | 1,9 (1,2-2,6)   | 1,9 (0,6-2,3) |
| Rechute              | 8 (10%)         | 14 (13%)        | 2 (3%)        |
| Délai médian en mois | 13,6 (6,9-70,6) | 13,8 (6,9-46,8) | 12,4 (9-15,7) |

**Table 5 : Progression et rechute dans les différents sous-types de COO.**

Le traitement n'impactait pas de façon significative la PFS à 5 ans dans les différents sous-types de COO, cependant le sous-type PMBL semblait afficher une PFS à 5 ans supérieure dans le bras intensif ( $94\% \pm 4\%$  *versus*  $83\% \pm 6\%$  dans le bras RCHOP,  $p=0,15$ ) sans atteindre la significativité statistique (**Figure 8**).

De façon intéressante, la TEP intermédiaire perdait sa valeur pronostique sur la PFS dans le sous-type PMBL (HR=2,9 ; IC95% [0,56-15]  $p=0,2$ ) suggérant la présence de faux-positifs.

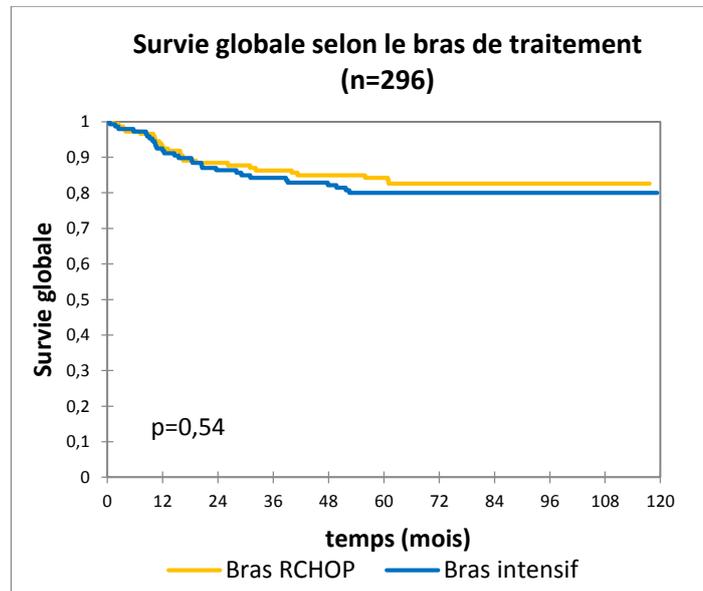
**Figure 8 : Survie sans progression** selon le sous-type COO (A), dans chaque bras de traitement (B et C), par sous-type en fonction du traitement (D, E, F).



## 5.2. SURVIE GLOBALE :

A 5 ans, la survie globale des 296 patients analysés était de  $83\% \pm 3\%$  dans le bras RCHOP et de  $80\% \pm 3\%$  dans le bras intensif ( $p=0,54$ ) (**Figure 9**). Elle était comparable à celle de la population intégrale de l'essai GOELAMS-075 ( $n=323$ ) :  $84\% \pm 3\%$  dans le bras RCHOP et  $80\% \pm 3\%$  dans le bras intensif ( $p=0,39$ ).

**Figure 9** : Survie globale dans la population de LBDGC diagnostic confirmé ( $n=296$ ) en fonction du bras de traitement.



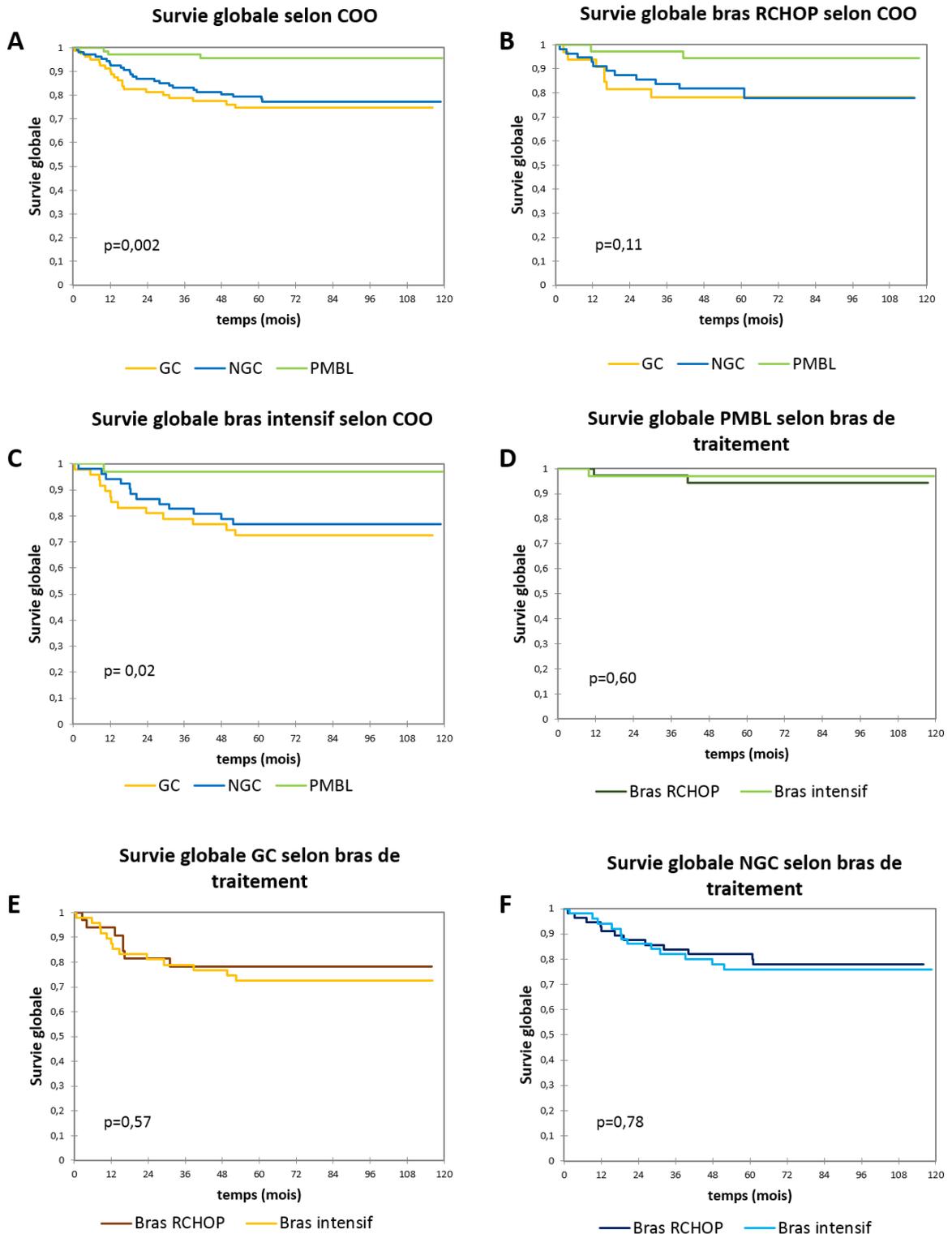
Les paramètres cliniques influençant la survie globale en analyse univariée étaient similaires entre la population d'étude ( $n=296$ ) et la population de l'essai GOELAMS-075 ( $n=323$ ) : l'envahissement médullaire ( $HR=4,9$  ;  $IC95\%$  [2,9-8,6],  $p<0,0001$ ), le score aalPI intermédiaire élevé ( $HR=2,1$  ;  $IC95\%$  [1,06-4,3]  $p=0,03$ ), le score aalPI élevé ( $HR=4,5$  ;  $IC95\%$  [2,02-9,8],  $p=0,0004$ ), le TEP intermédiaire positif ( $HR=2,2$  ;  $IC95\%$  [1,3-3,9]  $p=0,005$ ).

L'OS à 5 ans était de  $75\% \pm 5\%$  pour le sous-type GC, de  $78\% \pm 4\%$  dans le sous-type NGC et de  $96\% \pm 2\%$  pour le sous-type PMBL ( $HR$  PMBL=0,15 ;  $IC95\%$  [0,04-0,51]  $p=0,002$ ). Aucune différence n'était observée entre les sous-types GC et NGC ( $p=0,59$ ). La médiane de survie globale n'était atteinte dans

aucun sous-type. Le traitement n'influçait pas la survie globale dans les différents sous-types de COO (**Figure 10**).

Cinquante-quatre décès étaient rapportés dans notre population d'étude (18%), 25 dans le bras RCHOP (17%) et 29 dans le bras intensif (19%). Le lymphome était la cause la plus fréquente de décès, comptant pour 68% des décès dans le bras RCHOP et 62% dans le bras intensif. La part des décès toxiques était similaire dans les deux bras de traitement (24% des décès). Deux cas de seconds cancers entraînant le décès ont été rapportés dans le bras intensif (mélanome et syndrome myélodysplasique). Dans le sous-type GC, 20 décès sont survenus (25%), 60% d'entre eux étaient liés à la maladie et 25% à une cause toxique. Vingt-quatre décès ont été notés dans le sous-type NGC (22%), 67% liés à la maladie et 21% liés à une cause toxique. Seuls 3 décès (4%) étaient observés dans le sous-type PMBL, tous en lien avec la maladie.

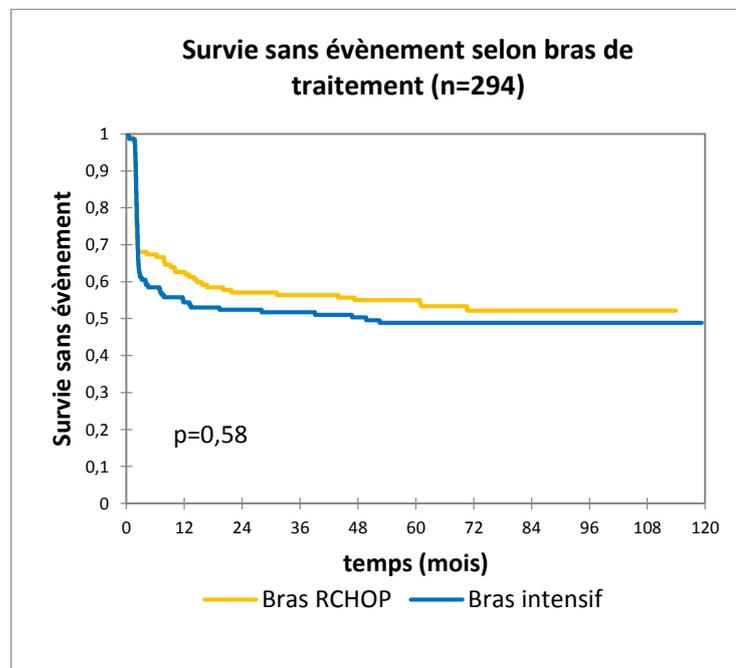
**Figure 10 : Survie globale** selon le sous-type COO (A), dans chaque bras de traitement (B et C), par sous-type en fonction du traitement (D, E, F).



### 5.3. SURVIE SANS EVENEMENT :

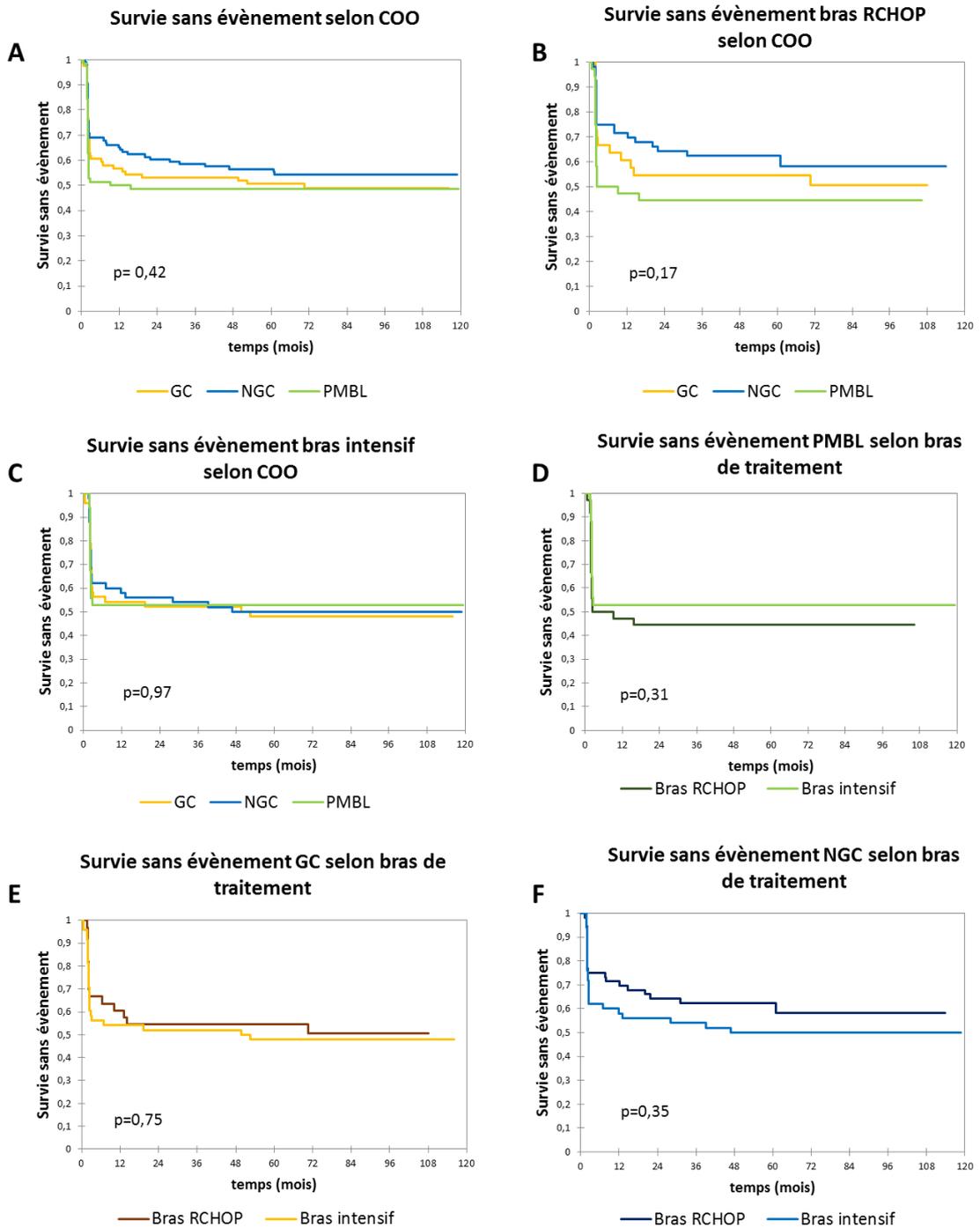
A 5 ans, la survie sans évènement pour la population d'étude (n=294) était de 54% ± 4% dans le bras RCHOP et de 49% ± 4% dans le bras intensif (p=0,58) (**Figure 11, Figure 14**). Elle était comparable à celle de la population intégrale de l'essai GOELAMS-075 (n=320) : 53% ± 4% dans le bras RCHOP et 48% ± 4% dans le bras intensif (p=0,63). La médiane de survie sans évènement était non atteinte dans le bras RCHOP et de 49,3 mois dans le bras intensif.

**Figure 11 : Survie sans évènement dans la population de LBDGC diagnostic confirmé avec donnée disponible (n=294) en fonction du bras de traitement.**



L'EFS à 5 ans était de 49% ± 6% pour le sous-type GC, de 55% ± 5% pour le sous-type NGC et de 48% ± 6% pour le sous-type PMBL (p=0,42). La médiane de survie sans évènement était de 70 mois pour le sous-type GC et de 15,7 mois pour le sous-type PMBL. Elle n'était pas atteinte pour le sous-type NGC. L'EFS n'était pas influencée par le traitement dans les différents sous-types de COO (**Figure 12**).

**Figure 12 : Survie sans évènement** selon le sous-type COO (A), dans chaque bras de traitement (B et C), par sous-type en fonction du traitement (D, E, F).



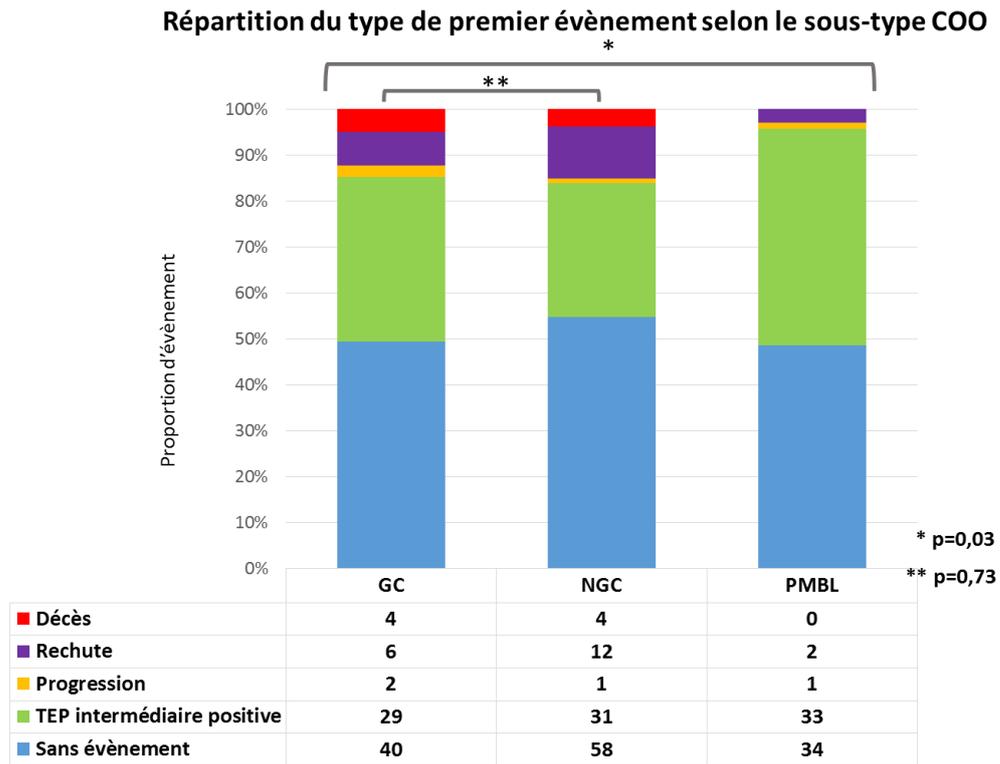
On retenait un taux d'évènement de 51% dans le sous-type GC et de 49% dans le sous-type NGC. La répartition du type de premier évènement était similaire dans les deux sous-types GC et NGC. La positivité de la TEP intermédiaire était retrouvée dans 70% des cas d'évènement dans le sous-type GC et dans 65% des cas NGC. La progression et la rechute représentaient 20% et 27% des cas d'évènement dans les sous-types GC et NGC respectivement. Le décès comptait pour 10% et 8% des cas d'évènement des sous-types GC et NGC respectivement. Le taux d'évènement était de 49% dans le sous-type PMBL, largement représenté par le taux de TEP intermédiaire positive (92%), la progression et la rechute comptant pour 3% et 5% des évènements. La répartition du type de premier évènement était superposable dans les deux bras de traitement pour chaque sous-type (**Figure 13**).

A l'évaluation intermédiaire, 10 patients GC dans le bras RCHOP et 19 patients GC dans le bras intensif présentaient une TEP positive (30% et 42% respectivement). Une chimiothérapie de rattrapage était appliquée pour 9 patients GC dans le bras RCHOP (90%) et 17 patients GC dans le bras intensif (89%). L'intensification-autogreffe après rattrapage était réalisée pour 7 patients dans le bras RCHOP (70%) et 13 patients GC dans le bras intensif (68%). Cette attitude permettait l'obtention d'un taux de réponse globale (RC et RP) de 50% dans le bras RCHOP et de 58% dans le bras intensif après rattrapage (**Figure 15**).

Dans le sous-type NGC, 13 cas TEP positive à l'évaluation intermédiaire (24%) dans le bras RCHOP et 19 (37%) dans le bras intensif étaient observés. Une chimiothérapie de rattrapage a été effective pour 11 patients (85%) et 15 patients (83%) dans les bras RCHOP et intensif respectivement, conduisant à la réalisation d'une intensification-autogreffe après rattrapage pour 8 patients dans le bras RCHOP (61%) et 13 patients dans le bras intensif (72%). A l'issue de la procédure de rattrapage, le taux de réponse globale était de 53% dans le bras RCHOP et de 58% dans le bras intensif (**Figure 16**).

Dans le sous-type PMBL, la positivité de la TEP intermédiaire était plus fréquemment observée : 17 cas (48%) dans le bras RCHOP et 16 cas (47%) dans le bras intensif. Une chimiothérapie de rattrapage était réalisée pour 14

patients (82%) dans le bras RCHOP et pour 15 patients (94%) dans le bras intensif, avec intensification thérapeutique au décours pour respectivement 11 patients (65%) et 13 patients (81%). Le taux de réponse globale était de 65% dans le bras RCHOP et de 75% dans le bras intensif après procédure de rattrapage (**Figure 17**).



**Figure 13** : Répartition du type de premier évènement « EFS » dans les différents sous-types COO.

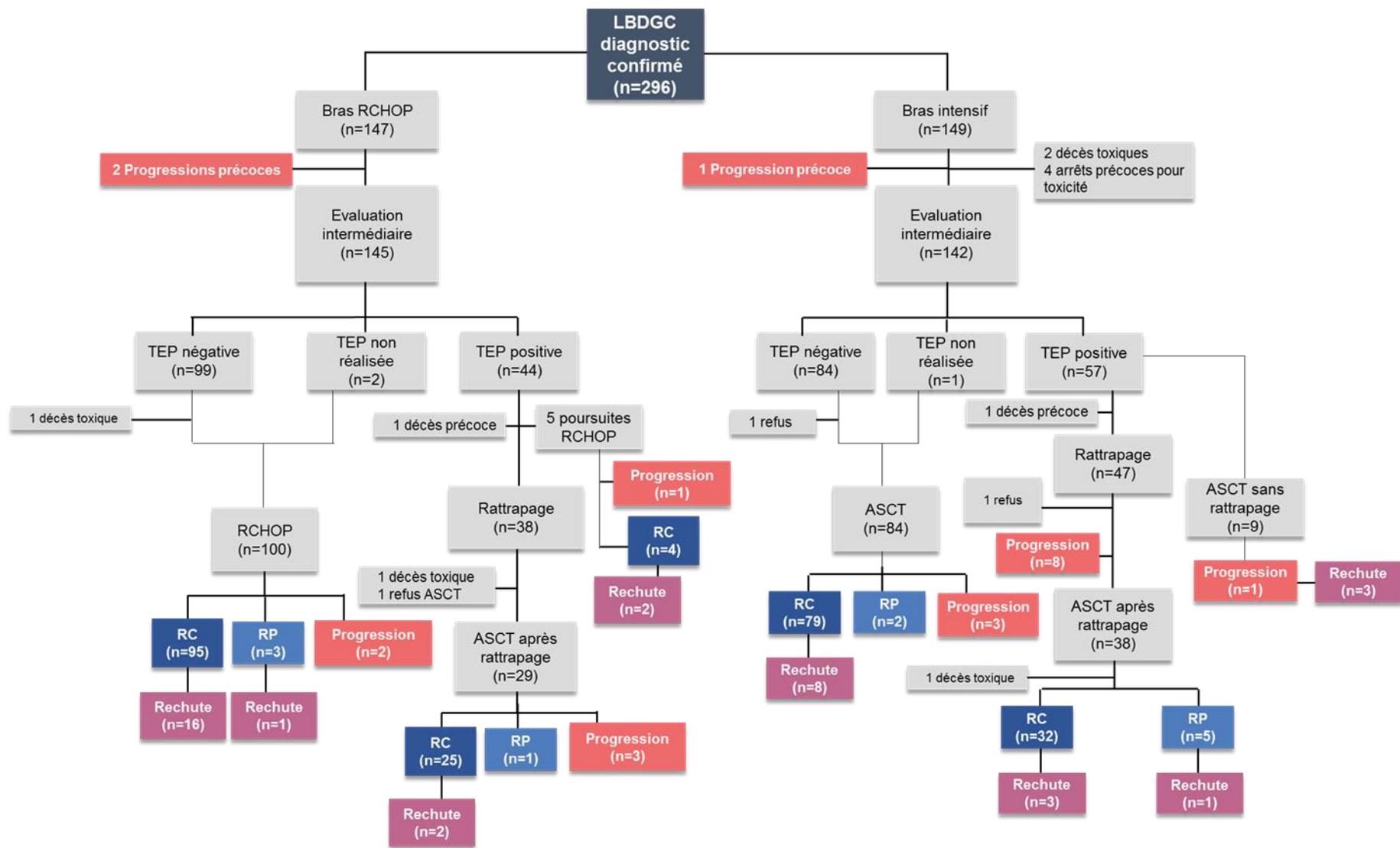


Figure 14 : Flowchart des cas diagnostic confirmé (n=296) en fonction du traitement. RC = réponse complète. RP = réponse partielle.



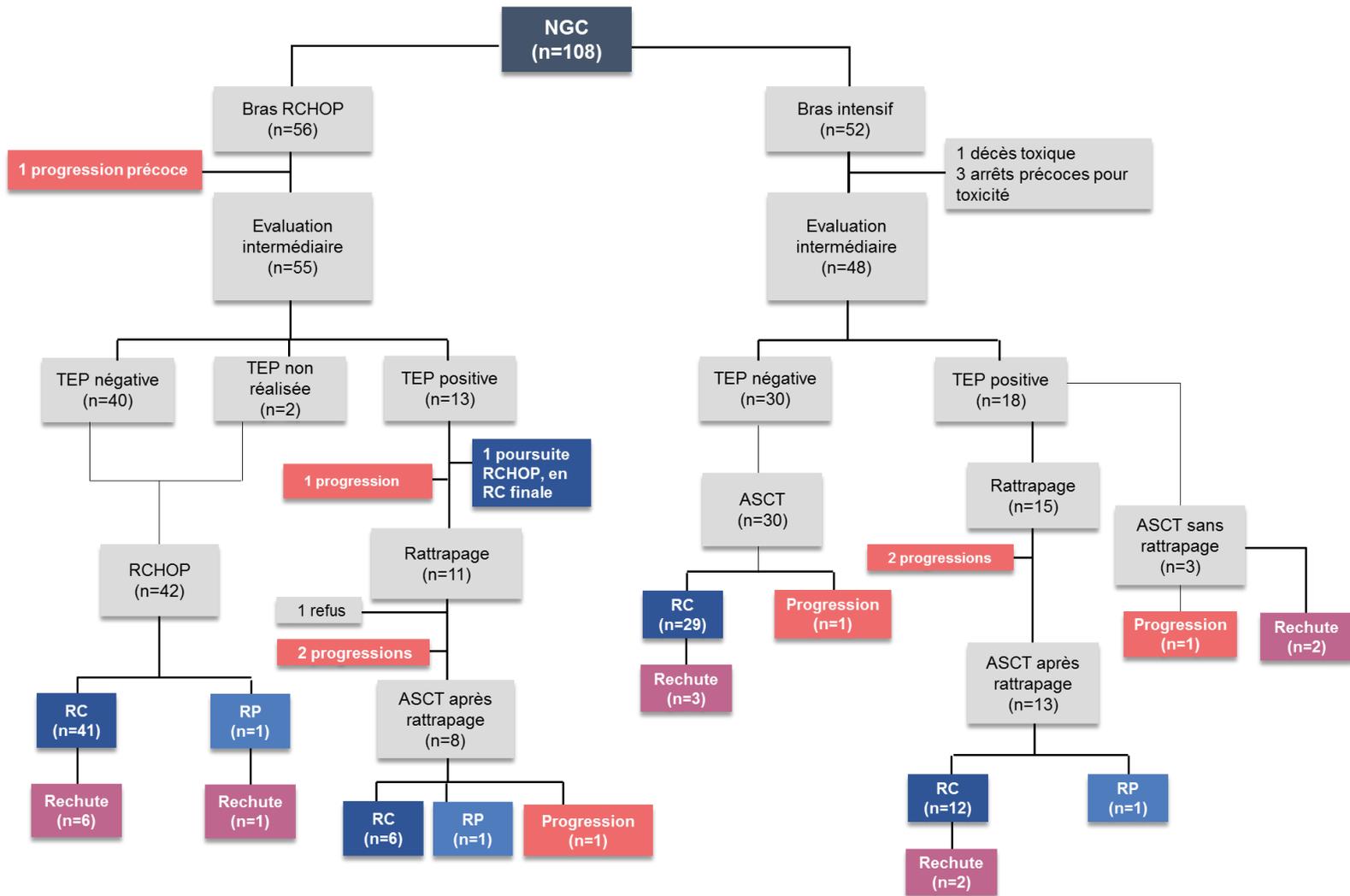


Figure 16 : Flowchart des cas NGC en fonction du traitement. RC = réponse complète. RP = réponse partielle.

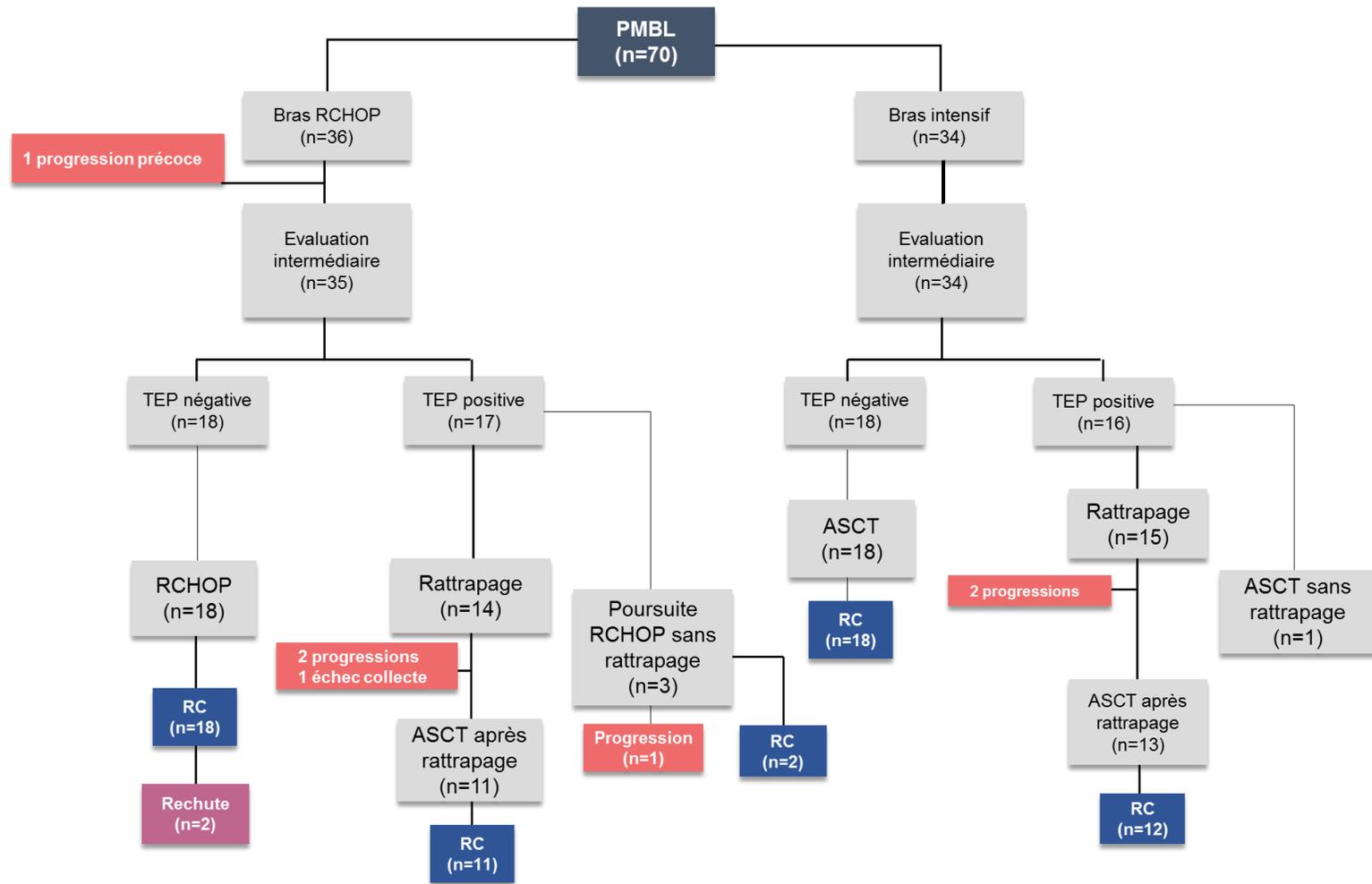
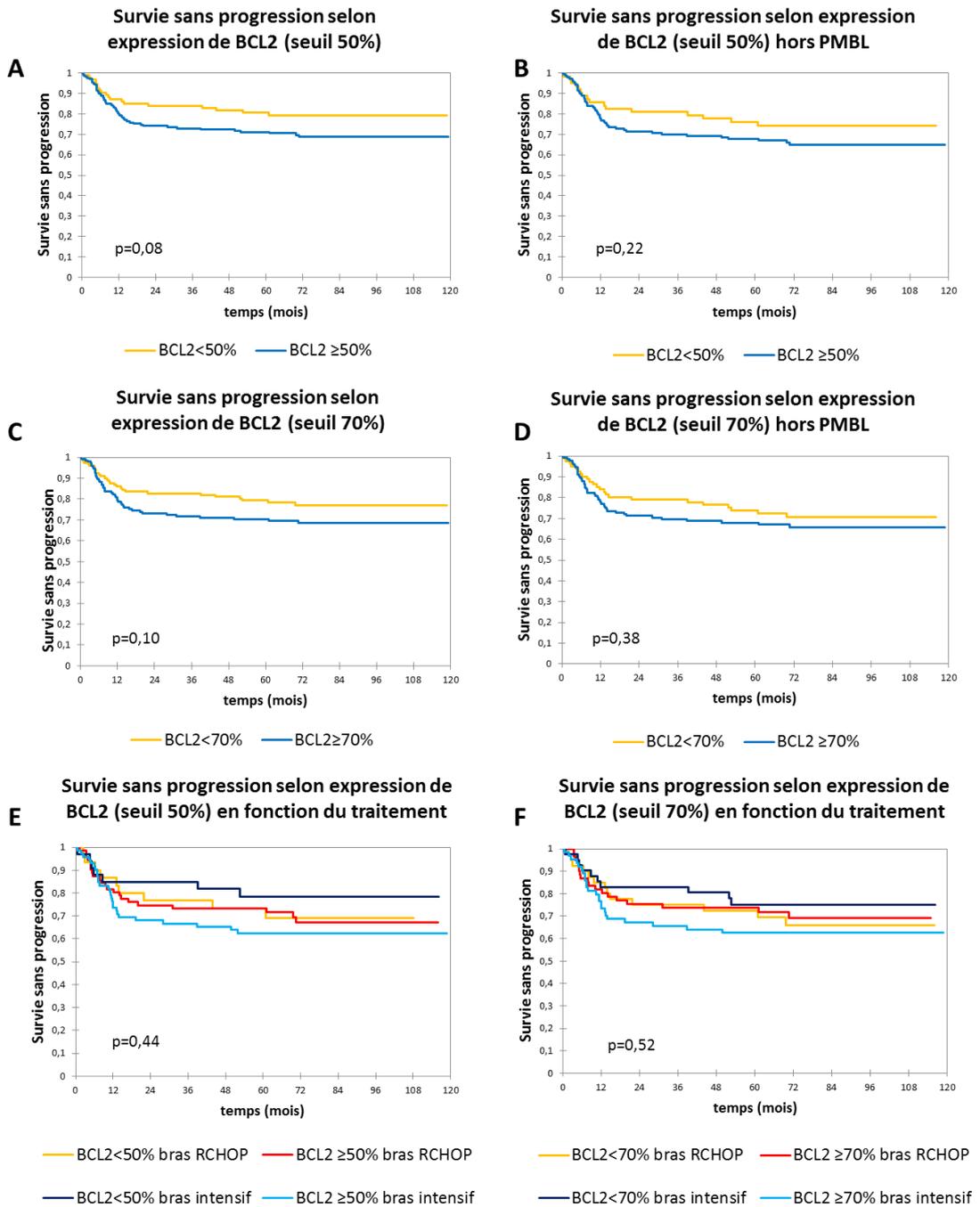


Figure 17 : Flowchart des cas PMBL en fonction du traitement. RC = réponse complète

## 6. VALEUR PRONOSTIQUE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES BCL2 ET MYC

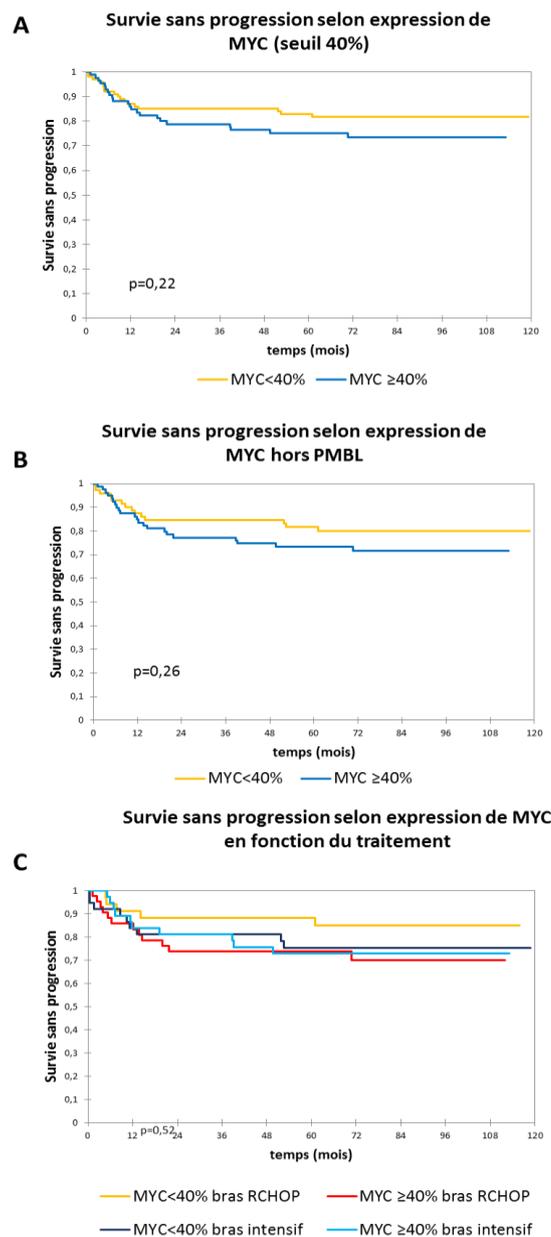
### 6.1. SURVIE SANS PROGRESSION :

A 5 ans dans la population analysée (n=268), la PFS était de 79% ± 4% pour les cas exprimant BCL2 <50% et de 71% ± 4% pour les cas exprimant BCL2 ≥50% (p=0,08). Après exclusion des PMBL, cette différence était discrètement réduite : 74% ± 6% pour les cas exprimant BCL2<50% et 67% ± 4% pour les cas exprimant BCL2 ≥50% (p=0,22). Lorsque le seuil de 70% était choisi pour l'expression de BCL2, la PFS à 5 ans était sensiblement identique : 78% ± 4% si BCL2 <70% et 70% ± 4% si BCL2 ≥70% (p=0,10). L'exclusion des PMBL influençait peu ces résultats : 73% ± 5% si BCL2<70% et 67% ± 4% si BCL2 ≥70% (p=0,38). Aucune différence statistiquement significative n'était observée en fonction du bras de randomisation, quel que soit le seuil choisi (**Figure 18**).



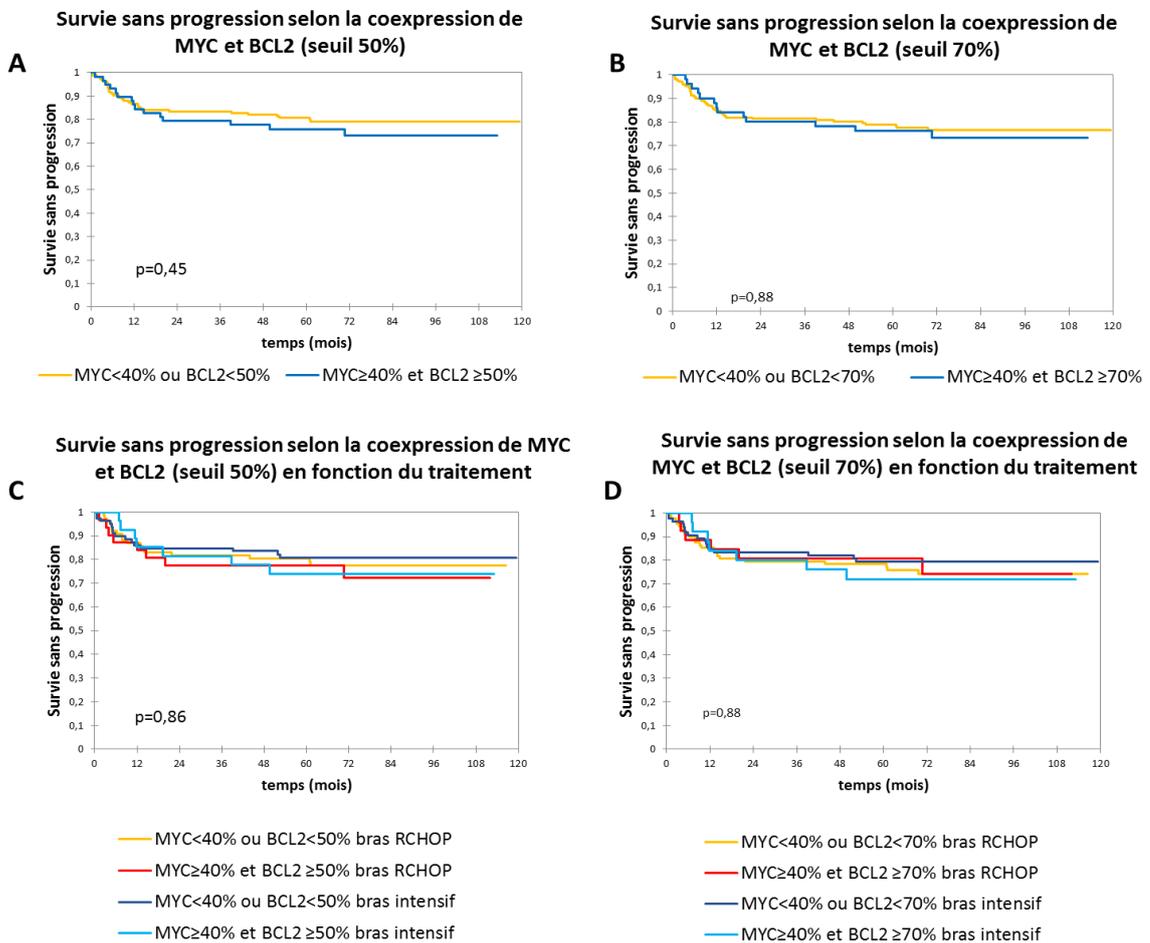
**Figure 18 : Survie sans progression** selon l'expression de la protéine BCL2 au seuil de 50% (A), ou au seuil de 70% (C), après exclusion des cas PMBL (B, D) et en fonction du bras de traitement (E et F).

Avec un seuil de 40%, l'expression de MYC n'apparaissait pas comme pronostique sur la PFS à 5 ans pour les 185 patients analysés :  $82\% \pm 4\%$  et  $73\% \pm 5\%$  pour les cas exprimant  $MYC < 40\%$  et les cas exprimant  $MYC \geq 40\%$  respectivement ( $p=0,22$ ). L'exclusion des PMBL n'apportait aucune information supplémentaire. Le traitement n'influçait pas de façon notable les résultats (**Figure 19**).



**Figure 19** : Survie sans progression selon l'expression de la protéine MYC (A), après exclusion des cas PMBL (B) et en fonction du bras de traitement (C).

La coexpression des protéines BCL2 et MYC, quel que soit le seuil d'expression de BCL2 choisi (50% ou 70%) n'avait pas de valeur pronostique sur la PFS dans cette étude : on observait un taux de PFS à 5 ans de  $79\% \pm 3\%$  pour les cas coexprimant BCL2  $\geq 50\%$  et MYC  $\geq 40\%$  versus  $73\% \pm 6\%$  pour les cas ne coexprimant pas ces deux protéines ( $p=0,45$ ) ;  $73\% \pm 6\%$  pour les cas coexprimant BCL2  $\geq 70\%$  et MYC  $\geq 40\%$  versus  $74\% \pm 4\%$  pour les cas ne coexprimant pas ces deux protéines ( $p=0,88$ ). Le traitement n'influçait pas ces résultats (**Figure 20**).

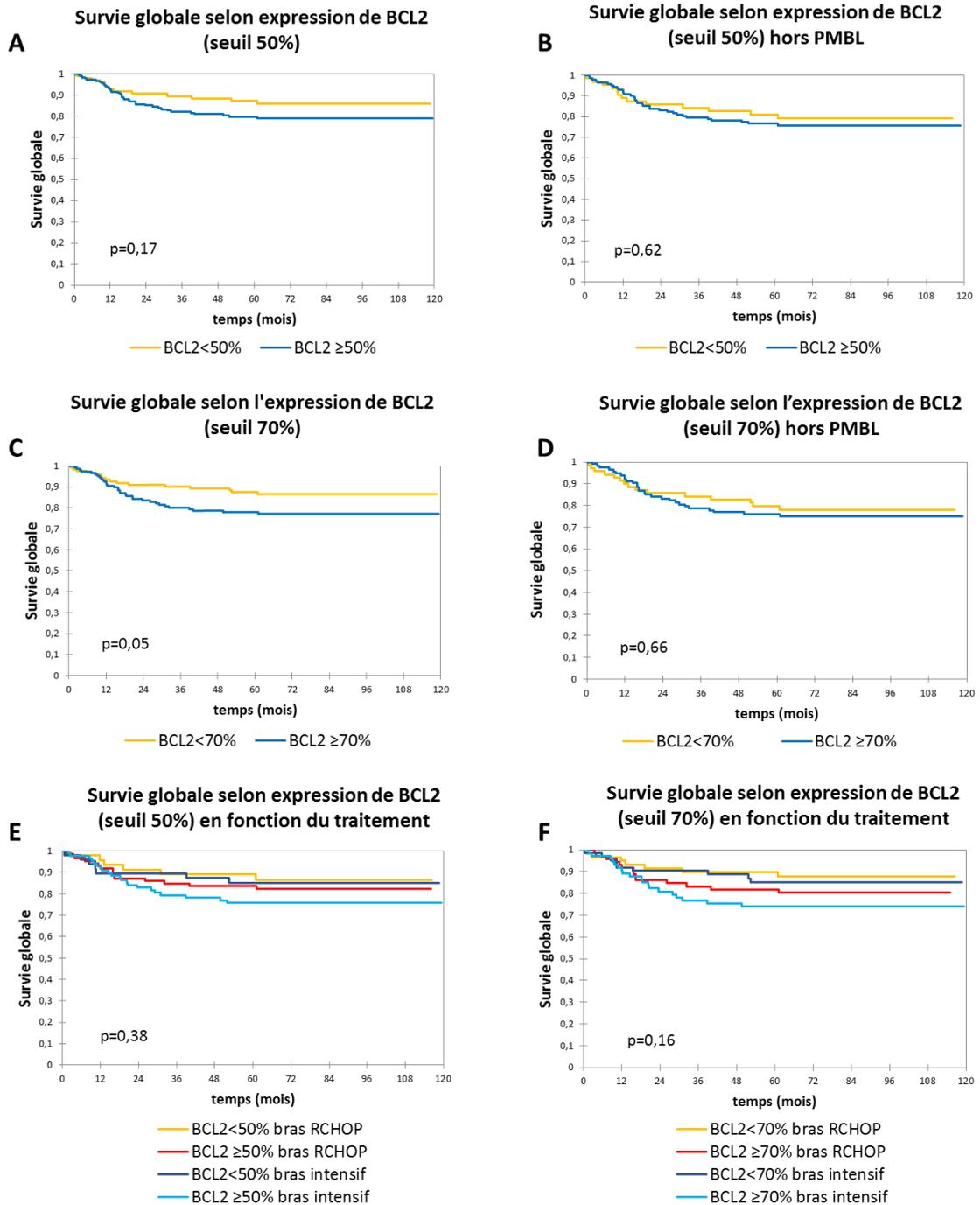


**Figure 20 :** Survie sans progression selon la coexpression de MYC et BCL2 seuil 50% (A) ou seuil 70% (B), et en fonction du bras de traitement (C et D).

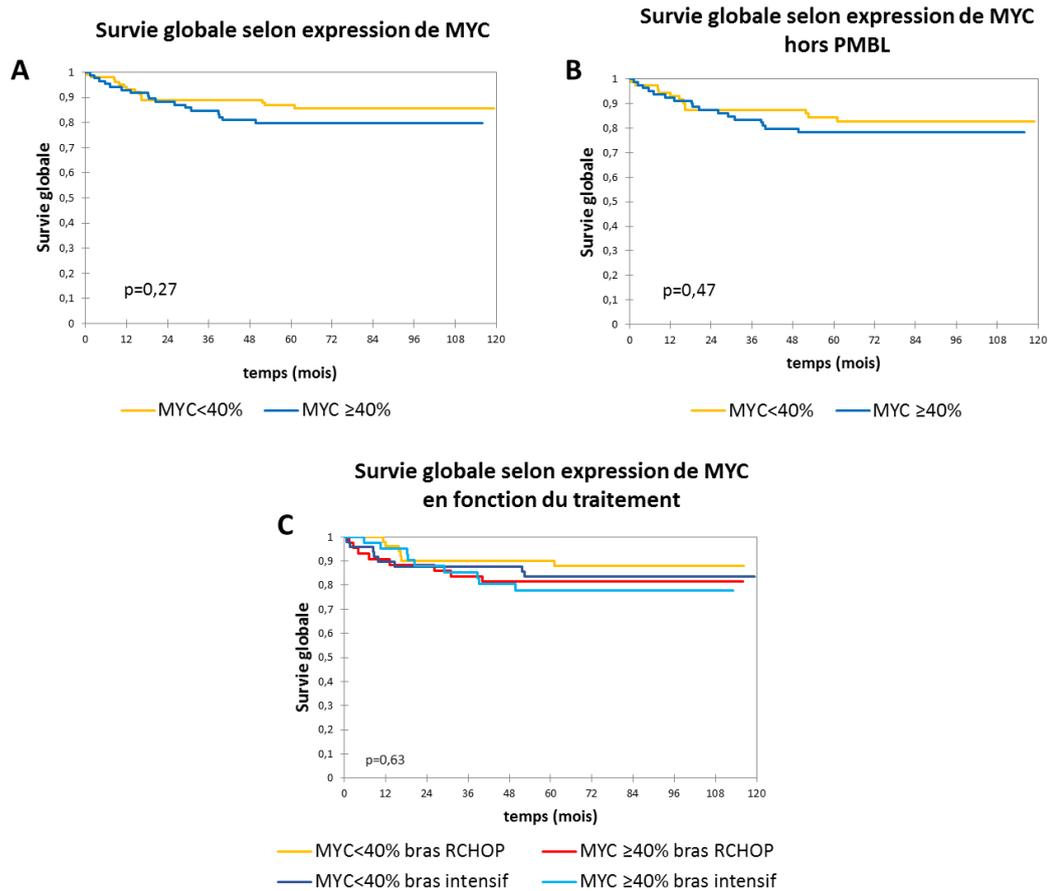
## 6.2. SURVIE GLOBALE :

A 5 ans, le taux de survie globale était de  $86\% \pm 4\%$  pour les cas exprimant BCL2  $<50\%$  et de  $79\% \pm 3\%$  pour les cas exprimant BCL2  $\geq 50\%$  ( $p=0,17$ ). Lorsque le seuil de  $70\%$  était choisi pour l'expression de BCL2, le taux de survie était de  $87\% \pm 3\%$  si BCL2  $<70\%$  et  $77\% \pm 4\%$  si BCL2  $\geq 70\%$  ( $p=0,05$ ). L'exclusion des PMBL influençait ces résultats, rendant cette différence non statistiquement significative :  $78\% \pm 5\%$  si BCL2  $<70\%$  et  $75\% \pm 4\%$  si BCL2  $\geq 70\%$  ( $p=0,66$ ). Aucune différence statistiquement significative n'était observée en fonction du bras de randomisation, quel que soit le seuil choisi (**Figure 21**).

Au seuil choisi de  $40\%$ , l'expression de MYC n'apparaissait pas comme pronostique sur la survie globale à 5 ans pour les 185 patients analysés :  $86\% \pm 4\%$  pour les cas exprimant MYC  $<40\%$  et  $80\% \pm 4\%$  pour les cas exprimant MYC  $\geq 40\%$  ( $p=0,27$ ). L'exclusion des PMBL n'apportait aucune information supplémentaire. Le traitement n'influençait pas de façon notable les résultats :  $88\% \pm 4\%$  si MYC  $<40\%$  *versus*  $81\% \pm 6\%$  si MYC  $\geq 40\%$  dans le bras RCHOP et  $84\% \pm 5\%$  si MYC  $<40\%$  *versus*  $78\% \pm 6\%$  si MYC  $\geq 40\%$  dans le bras intensif ( $p=0,67$ ) (**Figure 22**).

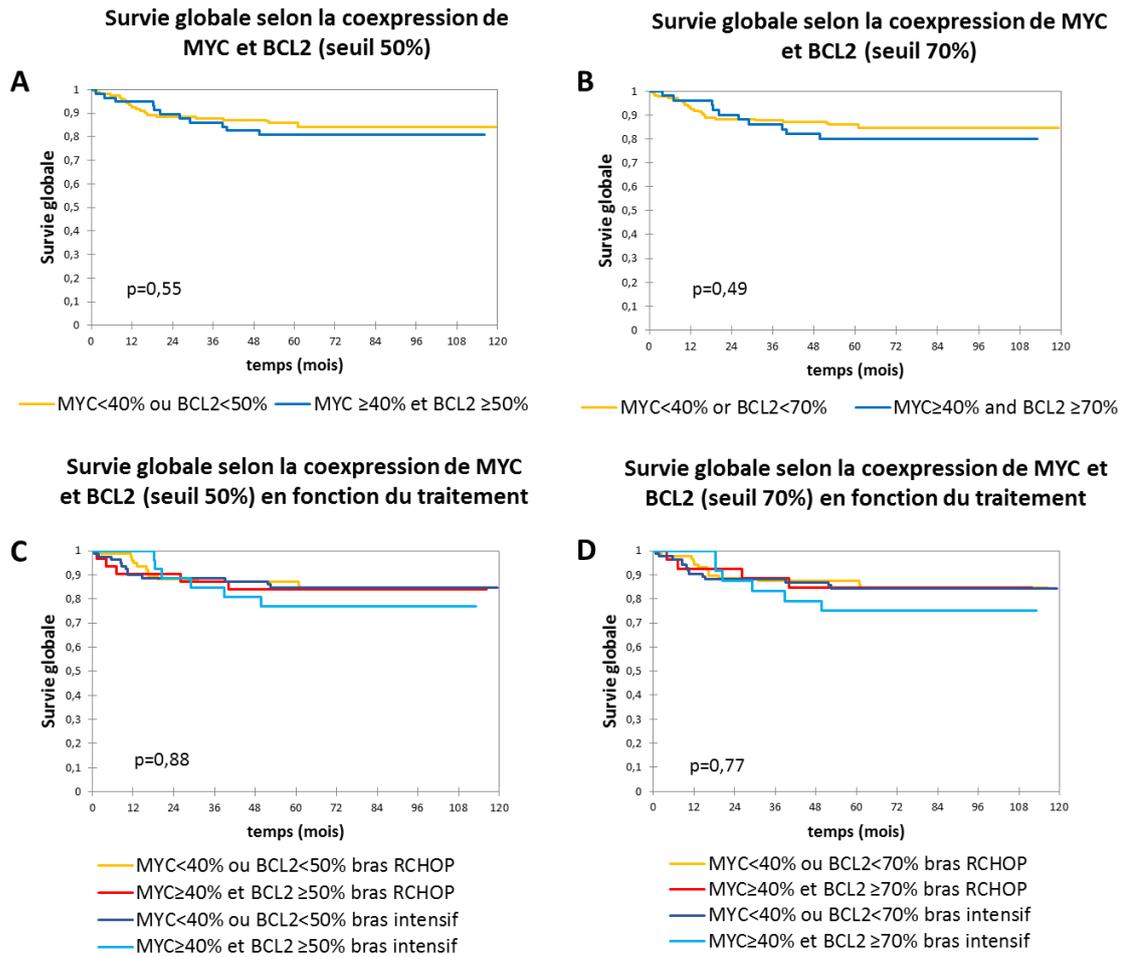


**Figure 21** : Survie globale selon l'expression de la protéine BCL2 au seuil de 50% (A), ou au seuil de 70% (C), après exclusion des cas PMBL (B, D) et en fonction du bras de traitement (E et F).



**Figure 22:** Survie globale selon l'expression de la protéine MYC (A), après exclusion des cas PMBL (B) et en fonction du bras de traitement (C).

Le taux de survie globale n'était pas influencé par la coexpression des protéines BCL2 et MYC, quel que soit le seuil d'expression de BCL2 choisi (50% ou 70%) : 81% ± 5% pour les cas coexprimant BCL2 ≥ 50% et MYC ≥ 40% *versus* 84% ± 3% pour les cas ne coexprimant pas ces deux protéines (p=0,55) ; 80% ± 6% pour les cas coexprimant BCL2 ≥ 70% et MYC ≥ 40% *versus* 84% ± 3% pour les cas ne coexprimant pas ces deux protéines (p=0,49). Il n'était pas observé de différence en fonction du traitement reçu (**Figure 23**).

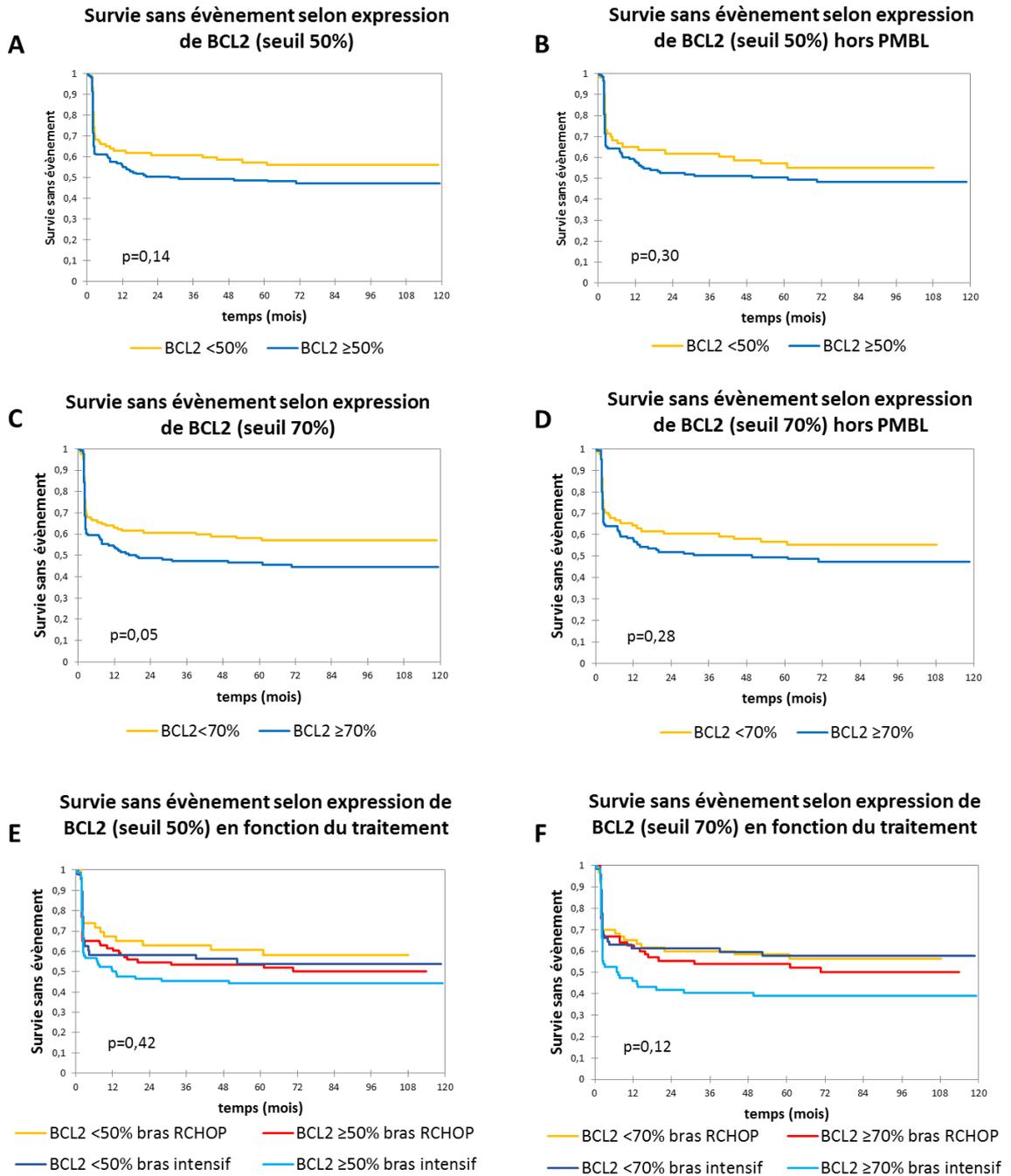


**Figure 23 : Survie sans progression selon la coexpression de MYC et BCL2 seuil 50% (A) ou seuil 70% (B), et en fonction du bras de traitement (C et D).**

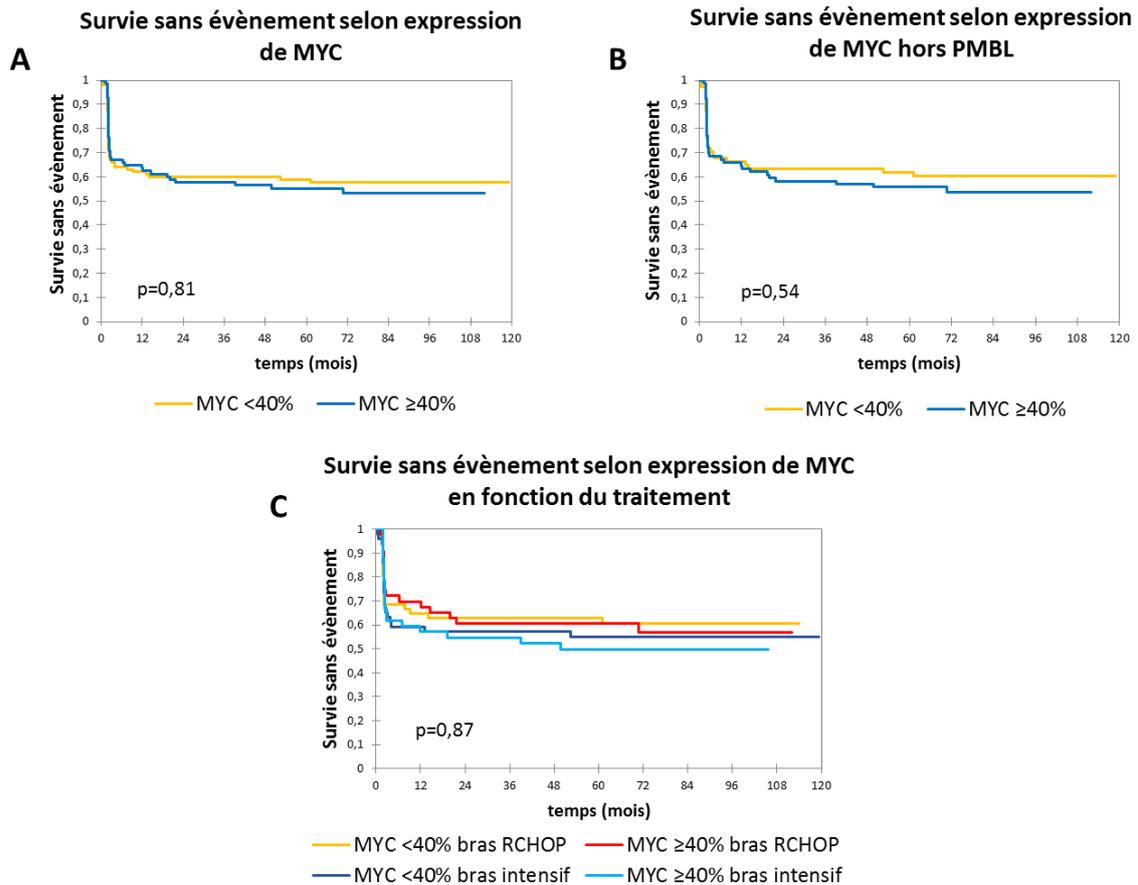
### 6.3. SURVIE SANS EVENEMENT :

A 5 ans, le taux de survie sans évènement était de 56% ± 5% pour les cas exprimant BCL2 <50% et de 48% ± 4% pour les cas exprimant BCL2 ≥50% (p=0,14). Lorsque le seuil de 70% était choisi pour l'expression de BCL2, le taux de survie sans évènement était de 57% ± 5% si BCL2 <70% et 45% ± 4% si BCL2 ≥70% (p=0,05). Après exclusion des PMBL, cette différence devenait non statistiquement significative : 55% ± 5% si BCL2<70% et 49% ± 5% si BCL2 ≥70% (p=0,28). Aucune différence statistiquement significative n'était observée en fonction du bras de randomisation, quel que soit le seuil choisi (**Figure 24**).

Le taux de survie sans évènement était de 58% ± 5% pour les cas exprimant MYC<40% et de 53% ± 5% pour les cas exprimant MYC ≥40% (p=0,81). L'exclusion des PMBL n'apportait aucune information supplémentaire. Le traitement n'influçait pas de façon notable les résultats (**Figure 25**).

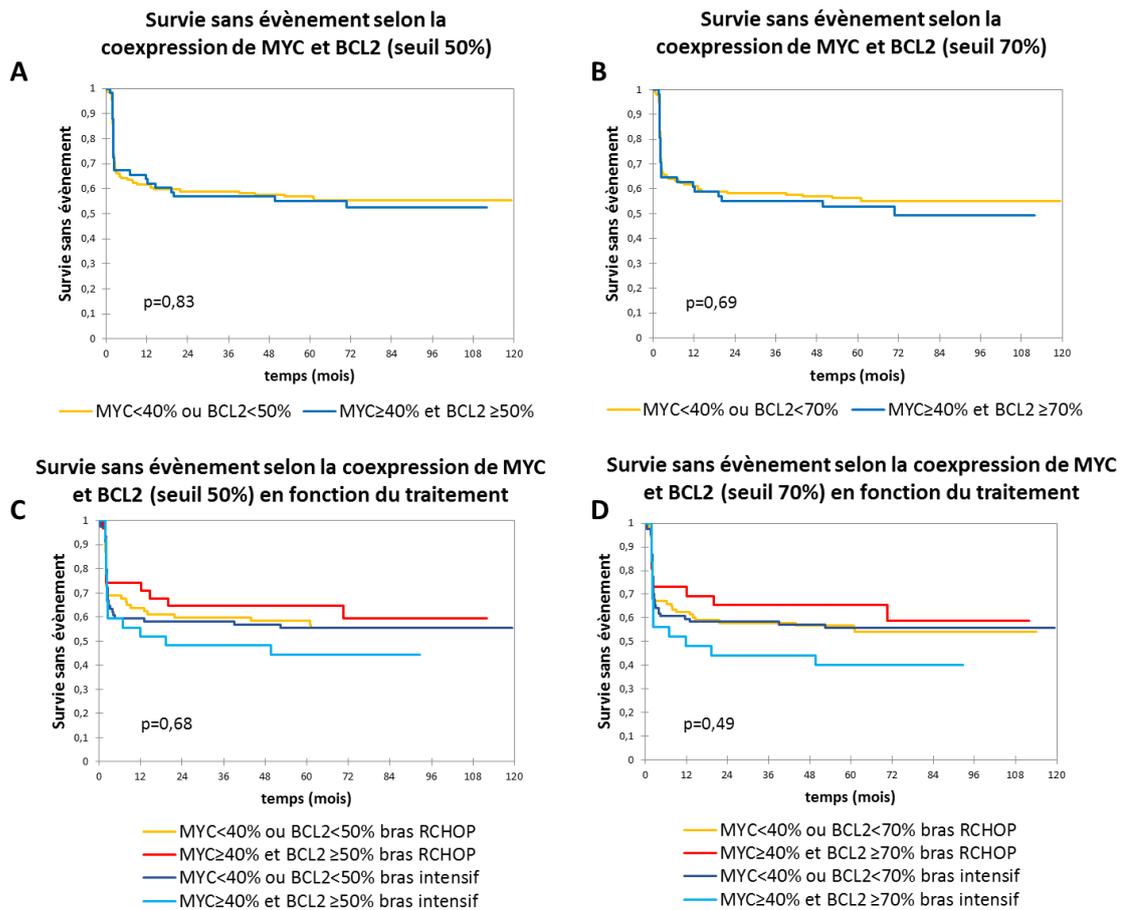


**Figure 24 : Survie sans évènement selon l'expression de la protéine BCL2 au seuil de 50% (A), ou au seuil de 70% (C), après exclusion des cas PMBL (B, D) et en fonction du bras de traitement (E et F).**



**Figure 25 :** Survie sans évènement selon l'expression de la protéine MYC (A), après exclusion des cas PMBL (B) et en fonction du bras de traitement (C).

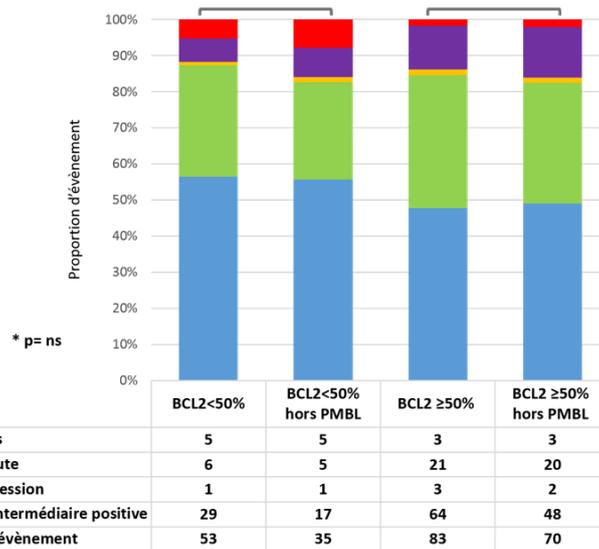
La coexpression des protéines BCL2 et MYC, quel que soit le seuil d'expression de BCL2 choisi (50% ou 70%) n'avait pas de valeur pronostique sur le taux de survie sans évènement :  $52\% \pm 7\%$  pour les cas coexprimant BCL2  $\geq 50\%$  et MYC  $\geq 40\%$  *versus*  $56\% \pm 4\%$  pour les cas ne coexprimant pas ces deux protéines ( $p=0,83$ ) ;  $49\% \pm 7\%$  pour les cas coexprimant BCL2  $\geq 70\%$  et MYC  $\geq 40\%$  *versus*  $56\% \pm 4\%$  pour les cas ne coexprimant pas ces deux protéines ( $p=0,69$ ). Il n'était pas observé de différence en fonction du traitement reçu (**Figure 26**).



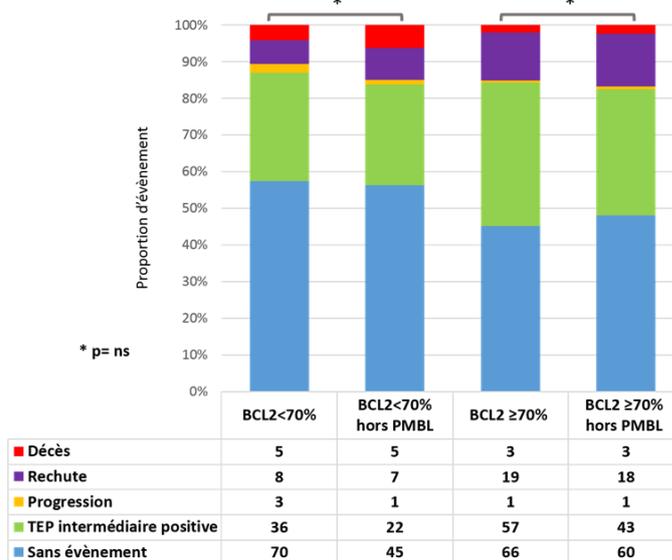
**Figure 26 : Survie sans évènement selon la coexpression de MYC et BCL2 seuil 50% (A) ou seuil 70% (B), et en fonction du bras de traitement (C et D).**

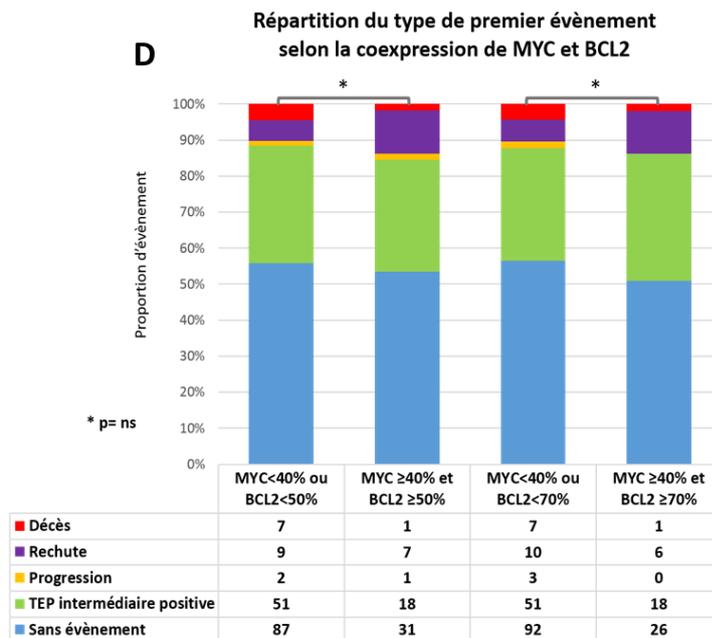
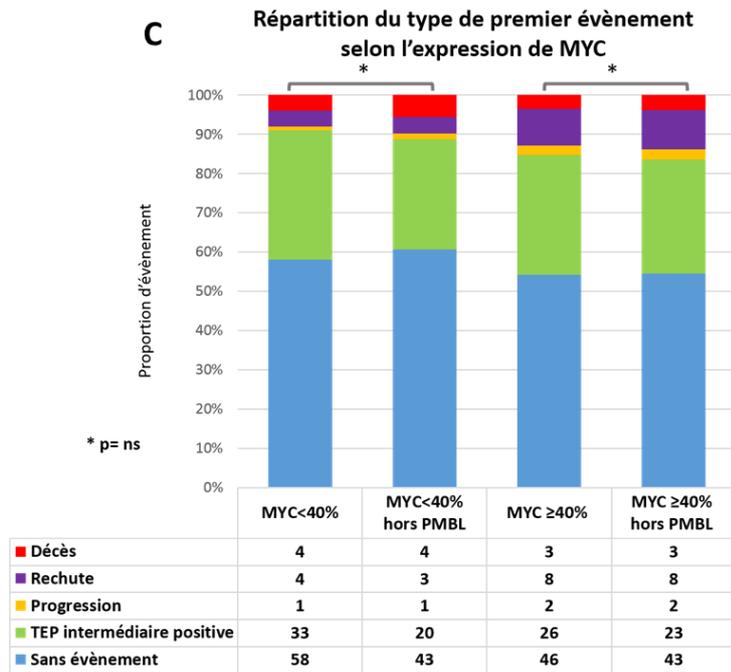
Le taux d'évènement était de 43% et de 44% dans les sous-groupes BCL2<50% et BCL2 ≥50% respectivement. Il était de 43% et de 55% dans les sous-groupes BCL2<70% et BCL2 ≥70% respectivement (p=0,05) ; après exclusion des PMBL, ce taux devenait : 43% pour le sous-groupe BCL2<70% et 52% pour le sous-groupe BCL2 ≥70% (p=0,25). Pour les cas exprimant MYC<40%, le taux était de 42% ; il était de 40% dans le sous-groupe MYC ≥40%. Les cas coexprimant MYC et BCL2 présentaient un taux d'évènement de 47% au seuil BCL2 ≥50% et de 49% au seuil BCL2 ≥70%, contre 44% pour les cas ne coexprimant pas ces protéines. Le type de premier évènement était dominé par la positivité de la TEP à l'évaluation intermédiaire (**Figure 27**).

**A** Répartition du type de premier évènement selon l'expression de BCL2 (seuil 50%)



**B** Répartition du type de premier évènement selon l'expression de BCL2 (seuil 70%)





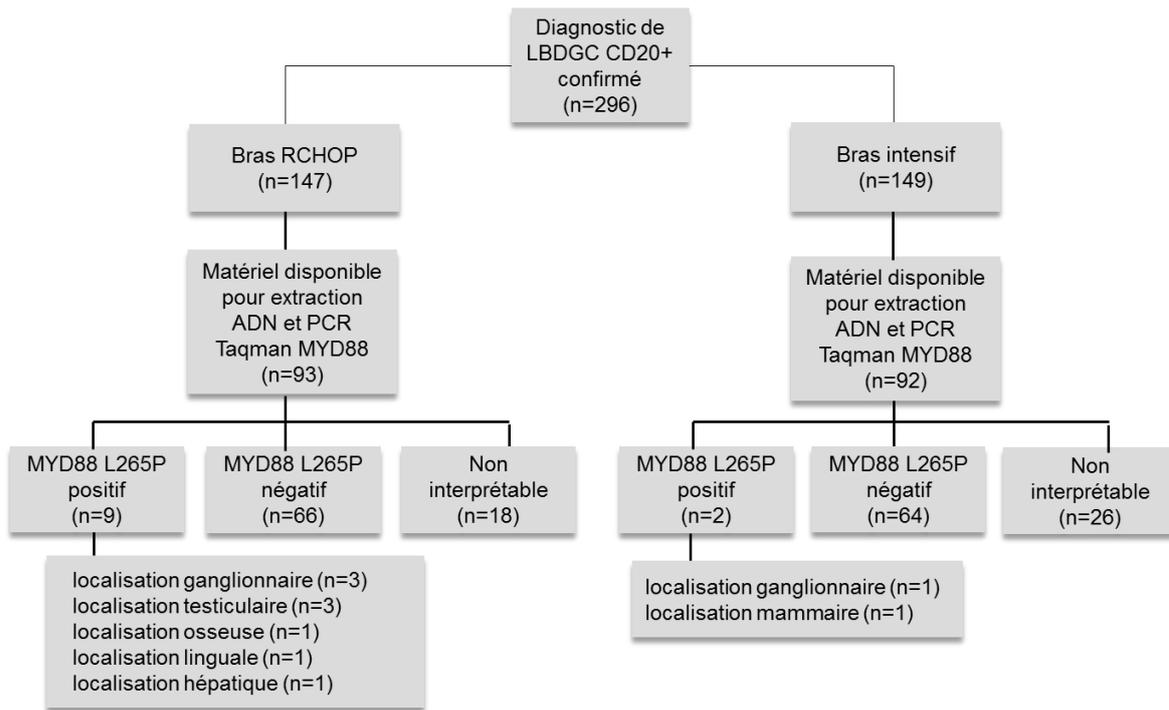
**Figure 27 : Répartition du type de premier évènement « EFS » en fonction de l'expression de BCL2, seuils 50% (A) et 70% (B), de l'expression de MYC (C) et de la coexpression de MYC et BCL2 (D)**

## 7. DETECTION DE LA MUTATION *MYD88* L265P

### 7.1. FREQUENCE DE MUTATION ET DONNEES CLINIQUES

Cent quatre-vingt-cinq cas de LBDGC CD20+ confirmé (63%) ont pu être analysés en biologie moléculaire compte-tenu d'une quantité et d'une qualité supposée de matériel histologique au diagnostic. L'extraction d'ADNg a pu être conduite à partir de tissu inclus en paraffine (172/195 cas) ou de fragment congelé (13/195 cas). L'extraction et l'amplification d'ADNg en PCR ont été réalisées avec succès dans 128/172 cas à partir de tissu inclus en paraffine (74%). Dans 44 cas, le résultat de PCR était ininterprétable en raison d'acides nucléiques dégradés (fixateur inadapté, décalcification préalable, prélèvement exigü). A partir de fragment congelé, l'extraction d'ADNg et la PCR ont été réalisées avec succès dans 100% des cas (n=13). Au total, 141 cas sur 296 LBDGC CD20+ (58%) confirmés étaient analysables pour la recherche de mutation *MYD88* L265P (**Figure 28**).

Onze cas de positivité de la mutation *MYD88* L265P ont été retrouvés (7,8%), 9 dans le bras RCHOP et 2 dans le bras intensif. Le site de prélèvement initial était hétérogène : 4 prélèvements ganglionnaires, 3 prélèvements testiculaires, 1 prélèvement osseux, 1 prélèvement mammaire, 1 prélèvement lingual, 1 prélèvement hépatique.



**Figure 28 :** Flowchart de la recherche de mutation L265P du gène *MYD88*.

Les caractéristiques des cas *MYD88* L265P négatifs étaient comparables à celles de la population globale du GOELAMS-075. L'âge médian était de 50,3 ans dans le groupe *MYD88* L265P positif (44,3-60,4) contre 48,8 ans dans le groupe *MYD88* L265P négatif (18,3-60,3). Soixante-quatre pourcents des cas appartenaient à la tranche d'âge 50-60 ans dans le groupe *MYD88* L265P positif. On observait une prédominance masculine plus prononcée (82%), une moindre fréquence de signes généraux (27%), une grande majorité de cas avec atteintes extra-ganglionnaires  $\geq 2$  (82%) et sites extra-nodaux initiaux (64%) pour les cas *MYD88* L265P mutés. Il n'y avait pas de différence significative pour le taux de LDH, le score ECOG, le caractère bulk, le stade III-IV, l'envahissement médullaire et le score aalPI entre les deux groupes.

Les cas mutés étaient de phénotype NGC à l'exception d'un cas non statuable pour la COO. La surexpression de BCL2 quel que soit le seuil, de MYC, et la coexpression de BCL2 et MYC étaient plus fréquemment observées dans le groupe *MYD88* L265P positif ( $p < 0,05$ ).

Les **Tableau 10** et **Tableau 11** résument les caractéristiques de la population analysée pour le statut *MYD88 L265P*.

Le taux d'évènement « EFS » était faible : 36% pour les cas mutés contre 48% pour les cas non mutés ( $p=0,05$ ). Le premier évènement le plus fréquent était la positivité du TEP, survenant chez 18% des cas mutés contre 32% chez les cas non mutés.

Un cas de rechute a été constaté dans le groupe *MYD88 L265P* positif (9%) contre 28 cas dans le groupe *MYD88 L265P* négatif (22%).

Un décès, non lié à la maladie (infection) a été rapporté dans le groupe *MYD88 L265P* positif (9%) contre 22 décès (17%) dans le groupe *MYD88 L265P* négatif, 72% ( $n=16$ ) d'entre eux étant liés à la maladie.

**Tableau 10 : Caractéristiques cliniques en fonction du statut MYD88 L265P (n=141).**

| Caractéristiques                              | Tous (n=141) |    | MYD88 L265P mutés (n=11) |    | MYD88 L265P non mutés (n=130) |    | p-value |
|---|--------------|----|--------------------------|----|-------------------------------|----|---------|
|   | No.          | %  | No.                      | %  | No.                           | %  |         |
| Bras de traitement                            |              |    |                          |    |                               |    | <0,0001 |
| RCHOP   | 75/141       | 53 | 9/11                     | 82 | 66/130                        | 51 |         |
| Intensif                                      | 66/141       | 47 | 2/11                     | 8  | 64/130                        | 49 |         |
| Age, années                                   |              |    |                          |    |                               |    | 0,03    |
| 18-49   | 72/141       | 51 | 4/11                     | 36 | 68/130                        | 52 |         |
| 50-60   | 69/141       | 49 | 7/11                     | 64 | 62/130                        | 48 |         |
| Age médian                                    | 49,5         |    | 50,3                     |    | 48,8                          |    |         |
| Sexe  |              |    |                          |    |                               |    | 0,2     |
| Masculin                                      | 84/141       | 60 | 9/11                     | 82 | 75/130                        | 58 |         |
| aalPI   |              |    |                          |    |                               |    | 0,99    |
| 0-1   | 49/141       | 35 | 4/11                     | 36 | 45/130                        | 35 |         |
| 2-3   | 92/141       | 65 | 7/11                     | 64 | 85/130                        | 65 |         |
| ECOG  |              |    |                          |    |                               |    | 0,99    |
| 2-4   | 27/141       | 19 | 2/11                     | 18 | 25/130                        | 19 |         |
| LDH   |              |    |                          |    |                               |    | 0,08    |
| Elevées                                       | 115/139      | 83 | 8/11                     | 73 | 107/128                       | 84 |         |
| Symptômes B                                   | 62/141       | 44 | 3/11                     | 27 | 59/130                        | 45 | 0,01    |
| Stade Ann Arbor                               |              |    |                          |    |                               |    | 0,09    |
| III-IV  | 116/141      | 82 | 10/11                    | 91 | 106/130                       | 82 |         |
| Envahissement médullaire                      |              |    |                          |    |                               |    | 0,64    |
| Oui   | 16/137       | 12 | 1/11                     | 9  | 15/126                        | 12 |         |
| Atteintes extra-ganglionnaires                |              |    |                          |    |                               |    | <0,0001 |
| ≥ 2   | 61/141       | 43 | 9/11                     | 82 | 52/130                        | 40 |         |
| Bulk  |              |    |                          |    |                               |    | 0,11    |
| ≥ 7 cm  | 77/137       | 56 | 5/11                     | 45 | 72/126                        | 57 |         |
| Site initial de prélèvement                   |              |    |                          |    |                               |    | <0,0001 |
| Nodal   | 100/141      | 71 | 4/11                     | 36 | 96/130                        | 74 |         |
| Extranodal                                    | 41/141       | 29 | 7/11                     | 64 | 34/130                        | 26 |         |
| Sous-type COO (IHC)                           |              |    |                          |    |                               |    | 0,005   |
| PMBL  | 26/141       | 18 | 0                        | 0  | 26/130                        | 20 |         |
| GC  | 42/141       | 30 | 0                        | 0  | 42/130                        | 32 |         |
| NGC   | 66/141       | 47 | 10/11                    | 91 | 56/130                        | 43 |         |
| Non statuable                                 | 7/141        | 5  | 1/11                     | 9  | 6/130                         | 5  |         |
| Expression protéine BCL2 (IHC)                |              |    |                          |    |                               |    | 0,0009  |
| ≥ 50%   | 86/139       | 62 | 9/11                     | 82 | 77/128                        | 60 |         |
| ≥ 70%   | 74/139       | 53 | 9/11                     | 82 | 65/128                        | 51 |         |
| Expression protéine MYC (IHC)                 |              |    |                          |    |                               |    | 0,0009  |
| ≥ 40%   | 55/114       | 48 | 7/10                     | 70 | 48/104                        | 46 |         |
| Coexpression protéines MYC-BCL2 (≥ 50%) (IHC) | 39/125       | 31 | 7/11                     | 64 | 32/114                        | 28 | <0,0001 |
| Coexpression protéines MYC-BCL2 (≥ 70%) (IHC) | 34/127       | 27 | 7/11                     | 64 | 27/116                        | 23 | <0,0001 |

**Tableau 11 : Données d'évènements selon le statut MYD88 L265P (n=141)**

| Caractéristiques            | Tous (n=141) |    | MYD88 L265P mutés (n=11) |     | MYD88 L265P non mutés (n=130)                                    |    | p-value |
|-----------------------------|--------------|----|--------------------------|-----|--|----|---------|
|                             | No.          | %  | No.                      | %   | No.  | %  |         |
| Premier évènement (EFS)     |              |    |                          |     |  |    | 0,05    |
| TEP intermédiaire positive  | 44/139       | 32 | 2/11                     | 18  | 42/128   | 32 |         |
| Progression                 | 2/139        | 1  | 0/11                     | 0   | 2/128  | 2  |         |
| Rechute                     | 14/139       | 10 | 1/11                     | 9   | 13/128   | 10 |         |
| Décès                       | 6/139        | 4  | 1/11                     | 9   | 5/128  | 4  |         |
| Absence d'évènement         | 73/139       | 53 | 7/11                     | 64  | 66/128   | 52 |         |
| Rechute / Progression (PFS) | 29/139       | 21 | 1/11                     | 9   | 28/128   | 22 | 0,02    |
| Décès (OS)                  | 23/141       | 16 | 1/11                     | 9   | 22/130   | 17 | <0,0001 |
| Décès liés à la maladie     | 16/23        | 70 | 0                        | 0   | 16/22  | 72 |         |
| Décès toxiques              | 3/23         | 13 | 0                        | 0   | 3/22   | 14 |         |
| Autre cause                 | 4/23         | 17 | 1/11                     | 100 | 3/22   | 14 |         |
|                             |              |    | - Infection              |     | - Autre cancer: 1<br>- Infection tardive: 1<br>- non expliqué: 1 |    |         |

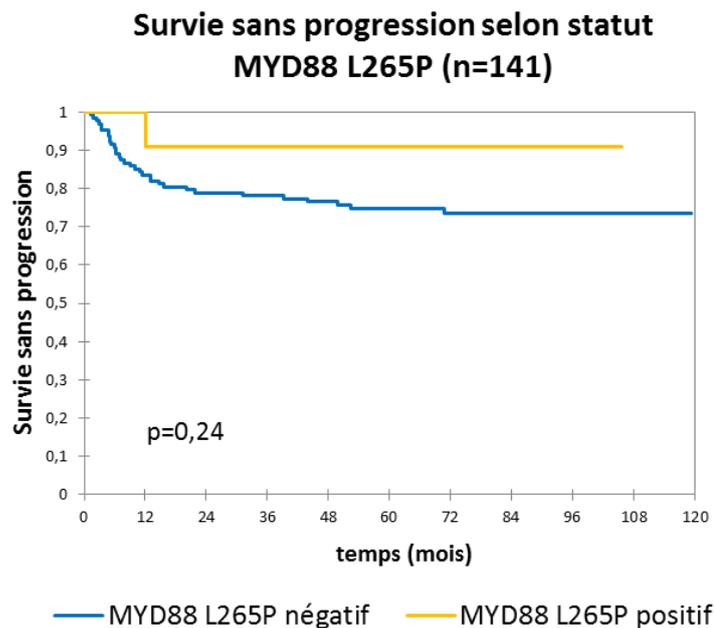
## 7.2. DONNEES DE SURVIE SELON LE STATUT MUTATIONNEL MYD88 L265P

La survie sans progression à 5 ans était de 91% ± 9% pour les cas *MYD88* L265P positifs *versus* 75% ± 4% pour les cas négatifs (p=0,24) (**Figure 29**).

La survie globale à 5 ans était de 91% ± 9% pour les cas *MYD88* L265P positifs *versus* 83% ± 3% pour les cas négatifs (p=0,49) (**Figure 30**).

A 5 ans, la survie sans évènement était de 73% ± 13% dans le groupe *MYD88* L265P positif contre 52% ± 4% dans le groupe *MYD88* L265P négatif (p=0,21) (**Figure 31**).

Le faible effectif des cas positifs ne permettait pas une comparaison des paramètres de survie en fonction du bras de traitement ou de caractéristiques cliniques associées.



**Figure 29** : Survie sans progression selon le statut MYD88 L265P.

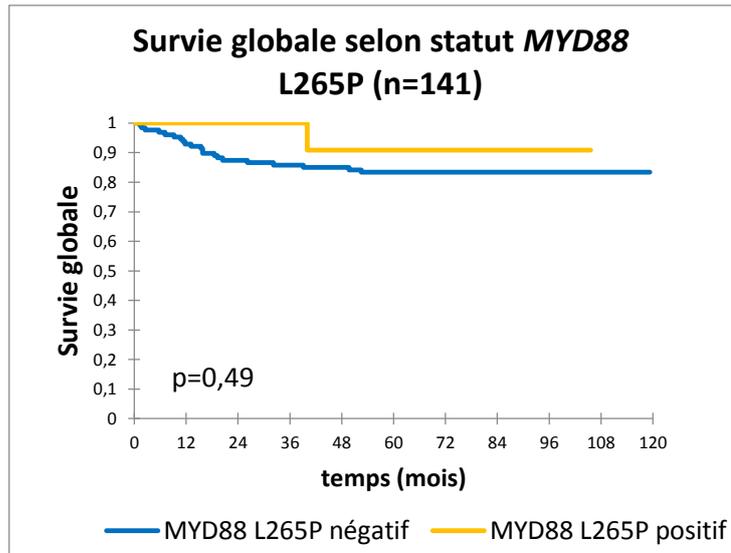


Figure 30 : Survie globale selon le statut MYD88 L265P.

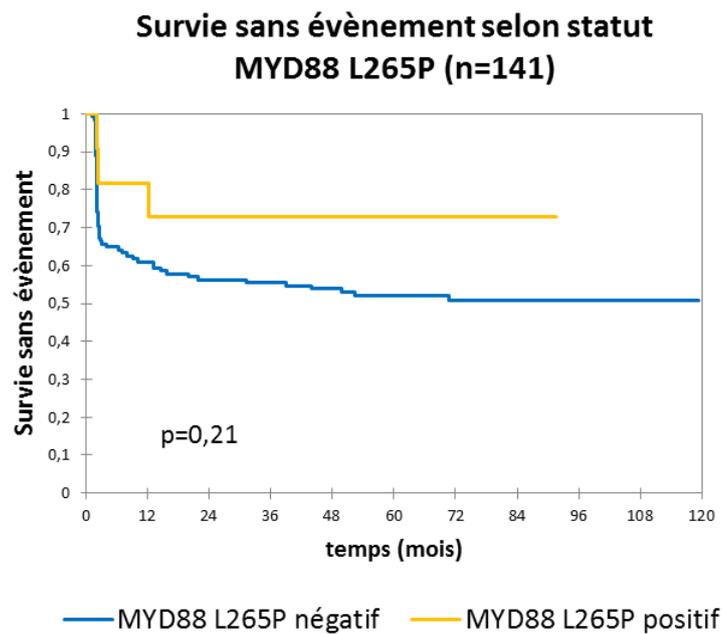


Figure 31 : Survie sans évènement selon le statut MYD88 L265P.

## DISCUSSION

Les résultats intermédiaires de l'essai GOELAMS-075 présentés à l'ASCO en 2011 mettaient en évidence une absence de supériorité de l'intensification thérapeutique en première ligne par comparaison au RCHOP14 sur l'ensemble des paramètres de survie. Cependant, la stratégie intensive à l'ère du Rituximab pourrait bénéficier à certains sous-groupes de patients sur la base de facteurs pronostiques établis comme certaines caractéristiques anatomopathologiques ou moléculaires.

### 1. L'ALGORITHME DE HANS, UN OUTIL INSUFFISANT DANS LA DETERMINATION DE LA COO ?

L'un des objectifs de cette étude était d'évaluer la valeur pronostique de la détermination de la COO par l'algorithme de Hans en IHC dans une large cohorte de patients jeunes atteints de LBDGC, majoritairement de risque intermédiaire ou élevé, traités dans l'essai GOELAMS-075 en première ligne par RCHOP ou par immunochimiothérapie suivie d'une intensification thérapeutique.

Dans cette population, il n'existait pas de différence entre les sous-types GC et NGC pour l'ensemble des paramètres de survie analysés et ce, quel que soit le traitement reçu. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses données publiées, et de façon générale les taux de survie globale et de survie sans progression observés dans notre population d'étude restaient tout à fait comparables aux données de la littérature à l'ère du Rituximab.

Trois explications possibles à cette observation si l'on considère qu'il doit y avoir une différence en prenant pour référence les résultats des études de GEP :

1. L'impact de la stratégie de traitement guidée par la TEP dans l'essai GOELAMS-075 :

Cette stratégie, qui reflète par ailleurs l'attitude thérapeutique actuelle, a probablement permis d'optimiser les résultats des patients moins bons répondeurs. En cas de TEP positive à l'évaluation intermédiaire, un traitement de rattrapage suivi d'une intensification thérapeutique avec autogreffe était proposé. Cette stratégie a possiblement gommé le pronostic défavorable en PFS et en OS de certains patients, et a pu masquer une hypothétique différence entre GC et NGC. Une remarque peut être faite cependant puisque la décision de modification du traitement reposait sur l'analyse de la TEP selon l'échelle visuelle et non selon les critères de Deauville recommandés actuellement.

2. L'algorithme de Hans n'est pas l'outil le plus approprié dans la détermination de la COO :

La sensibilité et la spécificité de l'algorithme de Hans dans la détermination de la COO peuvent être contestées par comparaison avec la technique de référence d'analyse des profils d'expression génique. Dans l'étude princeps de Hans(15), la sensibilité de l'algorithme était de 71% pour la détermination du phénotype GC et de 88% pour la détermination du phénotype NGC. Une large méta-analyse d'évaluation des différentes méthodes de détermination de la COO (en IHC et en GEP) a été conduite par Read(36). Celle-ci montrait une valeur pronostique du GEP sur l'OS (HR=1,85, IC95% [1,46-2,35]  $p < 0,0001$ ) et sur la PFS (HR=1,80, IC95% [1,36-2,38]  $p < 0,0001$ ) pour 1120 patients analysés. Pour les 1970 patients analysés avec l'algorithme de Hans elle montrait une absence de valeur pronostique sur l'OS (HR=1,27, IC95% [0,98-1,64]  $p = 0,07$ ) et un impact discret sur la PFS (HR=1,47, IC95% [1,09-2,03],  $p = 0,01$ ). L'étude rétrospective de Meyer(16) menée pour 262 patients consécutifs qui comparait les différents algorithmes disponibles en IHC avec l'analyse des profils d'expression génique retrouvait un taux de concordance de 86% entre l'algorithme de Hans (HR=2,2 IC95% [1,2-4] pour l'OS et HR=2,5 IC95% [1,5-4,3] pour l'EFS) et le GEP (HR=3,3 pour l'OS et HR=3,7 pour l'EFS). Ce taux était sensiblement superposable avec l'algorithme de Choi. L'algorithme de Tally offrait le taux de concordance le plus élevé (93%).

Cent-trente-cinq patients inclus dans une étude rétrospective multicentrique espagnole présentée par Gutierrez-Garcia(37) étaient évalués au diagnostic par 5 algorithmes IHC (Hans, Choi, Murriss, Colomo, Tally) avec données disponibles en GEP pour 62 d'entre eux. La plupart des cas discordants était de phénotype NGC en IHC et de profil GC en GEP. La sensibilité de l'algorithme de Hans pour la détermination des cas GC était de 52%. Elle était de 85% pour la détermination des cas NGC. Aucun des résultats produits par les différents algorithmes n'avait d'impact pronostique sur l'OS et la PFS. En revanche, la caractérisation de la COO par GEP conservait sa valeur pronostique : PFS et OS à 5 ans de 76% et 80% dans le sous-type GC *versus* 31% et 45% dans le sous-type ABC (PFS :  $p=0,005$  ; OS :  $p=0,03$ ). L'algorithme de Hans en méconnaissant des cas GC-GEP et en les attribuant au groupe NGC-IHC a probablement surestimé la survie de ce dernier.

En l'absence de biomarqueurs standardisés moins coûteux que l'analyse du transcriptome et plus fiables que les différents scores IHC, l'algorithme de Hans a été préféré dans notre étude en raison de sa simplicité d'utilisation et de sa large généralisation en routine. Cet algorithme IHC a permis de s'affranchir en partie des disparités pré-analytiques des prélèvements issus de l'essai GOELAMS-075 rendant difficile l'analyse transcriptomique. Les autres algorithmes n'ont pas été appliqués par manque d'expérience et de disponibilité des anticorps, par crainte d'épuisement du matériel. Une analyse transcriptomique (COO en GEP) est toutefois en cours de réalisation par l'équipe du Pr T. Fest au laboratoire d'Hématologie du CHU de Rennes et pourra être confrontée aux résultats de la présente étude.

La caractérisation de la COO au diagnostic a actuellement une importance majeure pour l'inclusion des patients dans les essais cliniques testant des molécules innovantes. Les critères d'inclusion reposent le plus souvent sur la détermination de la COO par l'algorithme de Hans. A la lumière de nos résultats, l'analyse de la COO en biologie moléculaire doit être préférée pour la stratification des patients dans les essais cliniques, soit en GEP, soit au moyen de techniques rapides et applicables à partir de matériel fixé

inclus en paraffine comme la technique RT-MLPA (Mareschal, Ruminy et al.(38)) et la technique Lymph2Cx (Scott et al.(9)). Des exigences pré-analytiques rigoureuses doivent être par ailleurs stipulées.

3. La ségrégation des cas PMBL a pu influencer les résultats par manque de puissance :

De façon attendue, la PFS et l'OS du sous-type PMBL étaient excellentes dans les deux bras de traitement. Le phénotype NGC majoritaire dans les cas PMBL induisait une surestimation des taux de survie des cas NGC sans distinction préalable. Par conséquent, les cas PMBL ont été séparés des cas GC et NGC. Les effectifs de ces derniers ont donc été diminués, pouvant induire un manque de puissance statistique. Toutefois, les effectifs restaient conséquents (81 cas GC, 108 cas NGC et 70 PMBL).

## 2. EXCELLENT PRONOSTIC DES PMBL AU PRIX D'UNE SUREXPOSITION A LA CHIMIOThERAPIE ?

Notre étude a confirmé l'excellent pronostic des patients atteints de LBDGC de type PMBL. La positivité du TEP intermédiaire était de loin l'évènement le plus fréquent dans le sous-groupe PMBL. Cet évènement a conduit à modifier le traitement au profit d'un rattrapage avec intensification pour 88% des cas « TEP positive ». Compte-tenu des résultats satisfaisants dans ce sous-groupe et de la superposition des courbes de PFS et d'OS (en parallèle de courbes d'EFS défavorables) la question se pose du nombre de faux-positifs en TEP, a fortiori sur de fortes masses tumorales médiastinales. En effet, la TEP n'apparaissait pas comme facteur pronostique sur la PFS et l'OS contrairement aux résultats observés dans les sous-groupes GC et NGC. Des observations similaires ont été rapportées par Vassilakopoulos(39),(40) qui avançait de plus que l'intensification thérapeutique-autogreffe ne paraissait pas être une alternative satisfaisante pour ces patients en raison de l'excès de toxicité potentiel à l'issue

de ce type de procédure. L'autre explication à cette superposition des courbes de survie serait une chimio-sensibilité accrue du sous-type PMBL aux drogues utilisées dans le traitement de rattrapage mais cette hypothèse reste à démontrer.

### 3. DES FACTEURS PRONOSTIQUES

#### « CLINIQUES » TOUJOURS RELEVANTS

Sur le plan clinique, dans notre population d'étude (n=296) seuls l'aalPI, la présence de sites extra-ganglionnaires, l'envahissement médullaire et la présence d'une TEP intermédiaire positive étaient pronostiques sur la survie sans progression et la survie globale en analyse univariée. Ces résultats font écho à une littérature abondante sur la valeur pronostique de ses caractéristiques cliniques. Le score pronostique aalPI était moins relevant pour les PMBL, plus fréquemment de faible risque ou de risque intermédiaire faible. Cette observation explique en partie la moins bonne distinction entre ces deux groupes pronostiques dans la cohorte globale de l'essai GOELAMS-075. Après exclusion des PMBL, le score aalPI devenait plus discriminant.

### 4. RELEVANCE PRONOSTIQUE DES PROTEINES

#### BCL2 ET MYC EN IHC ?

La présence d'une translocation chromosomique impliquant le gène MYC, isolée ou associée à une translocation de BCL2 ou BCL6, est associée à un pronostic sombre(28),(27) (médiane de survie globale allant de 12 à 59 mois selon les études), ce d'autant que son partenaire est le promoteur du gène *IGH*. De façon similaire à la détermination de la COO, des études de corrélation entre la positivité de la FISH MYC et le degré d'expression protéique en IHC ont été menées. Il a été mis en évidence une plus forte expression de MYC pour les cas réarrangés en FISH. Cependant, à l'ère du Rituximab, il ne semble pas exister

d'impact pronostique clairement établi du niveau d'expression protéique de MYC dans le LBDGC. L'IHC ne permet pas de s'affranchir de la recherche en FISH d'un réarrangement de *MYC*, et en cas de positivité, de *BCL2* et *BCL6*. L'expression protéique de *BCL2* isolée, évoquée comme pronostique à l'ère pré-Rituximab semble également perdre son importance pronostique avec l'introduction de cette thérapeutique(17), (21),(41),(42).

Une équipe danoise(17) a rapporté dans une large cohorte rétrospective hétérogène une survie à 3 ans défavorable (OS= 43% et PFS= 39%) des cas coexprimant *BCL2* (seuil 70%) et *MYC* (40%). Certains facteurs confondants dans le groupe coexpresseur pouvaient influencer les résultats au-delà de leur caractère rétrospectif : âge médian plus élevé (68ans), Performance Status défavorable. Une étude collaborative rétrospective sur près de 700 cas a été présentée par Hu en 2013(43), là-encore l'âge élevé était associé à une fréquence plus importante de la coexpression de *BCL2* (seuil 70%) et *MYC* (seuil 40%), et il existait une surreprésentation des cas IPI faible risque dans le groupe contrôle non coexpresseur pouvant participer aux différences observées en terme de survie (OS à 5 ans de 30% *versus* 75% et PFS à 5 ans de 27% *versus* 73%). L'étude de Johnson(28) a produit sensiblement les mêmes résultats à la différence que ceux-ci ont été ajustés sur la COO et l'IPI.

Seule une étude prospective réalisée chez 442 patients âgés de plus de 60 ans (essai RICOVER-60 comparant CHOP21 *versus* RCHOP21, Horn(44)) a produit un algorithme pronostique à partir de l'expression protéique de *MYC*, *BCL2* et *BCL6* : les cas surexprimant *MYC* et *BCL2* et ne surexprimant pas *BCL6* présentaient une survie globale à 3 ans de 41,6% *versus* près de 90% pour les cas ne surexprimant pas *MYC* et *BCL2* et surexprimant *BCL6*.

Chez le sujet jeune, notre étude prospective s'ajoute à celle de T. Molina(23) pour conforter l'idée qu'il ne semble pas exister de valeur pronostique de l'expression de *BCL2* et de *MYC*.

Toutefois dans notre étude, l'hétérogénéité de prélèvements et de fixateurs était un frein à l'analyse des données d'expression des protéines *BCL2* et *MYC* en

IHC, mais également à la mise en œuvre d'une analyse FISH pour recherche de translocation impliquant les gènes *MYC*, *BCL2* et *BCL6*.

## 5. ABSENCE DE VALEUR PRONOSTIQUE DE LA MUTATION L265P DU GENE *MYD88* :

L'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B est un des événements oncogéniques caractéristiques du LBDGC de phénotype NGC conférant un avantage en survie aux cellules lymphomateuses. Les altérations géniques touchant des acteurs moléculaires-clés intervenant dans cette voie (*MYD88*, *CD79a*, *CD79b*, *CARD11*, *A20*) ont été évoquées comme responsables de cette dépendance oncogénique. *MYD88* est une protéine adaptatrice située en aval de la signalisation des TLRs (Toll-like Receptors) et du récepteur à l'Interleukine-1 conduisant à l'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK (Mitogen-activated protein kinases). La mutation somatique L265P du gène *MYD88* dans l'exon 5 du chromosome 3 (codant pour le domaine TIR) est la plus fréquemment retrouvée dans le LBDGC (29%), majoritairement de sous-type moléculaire NGC(30). La responsabilité de la mutation *MYD88* L265P dans le pronostic intrinsèque défavorable du LBDGC ABC/NGC établi par Alizadeh méritait d'être soulevée. Notre étude a montré une fréquence de mutation moindre qu'attendue (7,8%) dans une population homogène et non sélectionnée de sujets jeunes atteints de LBDGC CD20+ non antérieurement traités. Cette fréquence rejoint les résultats obtenus de manière rétrospective par Fernandez-Rodriguez(35) (fréquence de mutation : 9,7%) chez 175 patients âgés de 25 à 88 ans (âge médian 70 ans). Une étude rétrospective coréenne(45) conduite chez 161 patients âgés de 34 à 88 ans (âge médian 63 ans) atteints de LBDGC non antérieurement traités, a retrouvé une fréquence de mutation de 19%. Dans ces deux études, la présence de la mutation *MYD88* L265P était associée à un âge plus élevé et aux formes extra-ganglionnaires (SNC, testicule, tractus gastro-intestinal, langue). Notre faible fréquence de mutation est expliquée en partie par un âge plus jeune de

notre population d'étude et l'exclusion des LBDGC primitifs du SNC. Les disparités pré-analytiques (fixateurs hétérogènes dégradant pour certains les acides nucléiques, exiguïté du matériel sur les drill-biopsies) expliquent le nombre de cas ininterprétables (44 cas) et ont pu toutefois concourir à minorer discrètement cette fréquence. Il est important de souligner que plusieurs études(46)(47) d'analyse des profils mutationnels dans le LBDGC ultérieures à celle de Ngo ont mis en évidence une fréquence de mutation *MYD88* L265P allant de 8 à 12%, ce qui laisse penser que le taux de 29% communément admis est probablement surestimé.

D'un point de vue technique, la PCR Taqman allèle-spécifique est un outil robuste qui offre une sensibilité de détection de mutation de l'ordre de  $5 \times 10^{-2}$ , supérieure à celle du séquençage Sanger. Le choix de cette technique dans la détection de la mutation *MYD88* L265P est justifié par son potentiel d'utilisation simple en routine, moins coûteux que le séquençage complet dans la détection de mutation ponctuelle. Elle présente de plus l'avantage d'éviter les manipulations post-amplification, sources de contamination.

La valeur pronostique de la mutation *MYD88* L265P a été rapportée uniquement dans l'étude espagnole de Fernandez-Rodriguez, incluant 10% de formes primitives du SNC (réputées de plus mauvais pronostic), cutanée (où la valeur pronostique a déjà été rapportée par Pham-Ledard et al.(48)) et testiculaire. La mutation était associée à une PFS et une OS inférieures à 4 ans de suivi (HR PFS= 2,4 p= 0,02 ; HR OS= 3,4 p= 0,002). Ces résultats n'ont pas été retrouvés dans l'étude coréenne où la mutation conférait une tendance vers un meilleur pronostic sur la survie globale (HR=0,57, p=0,22) et la survie sans progression (HR=0,57, p=0,20) malgré une différence dans le traitement reçu (26% des cas mutés traités par RCHOP *versus* 45% des cas non mutés, p=0,04).

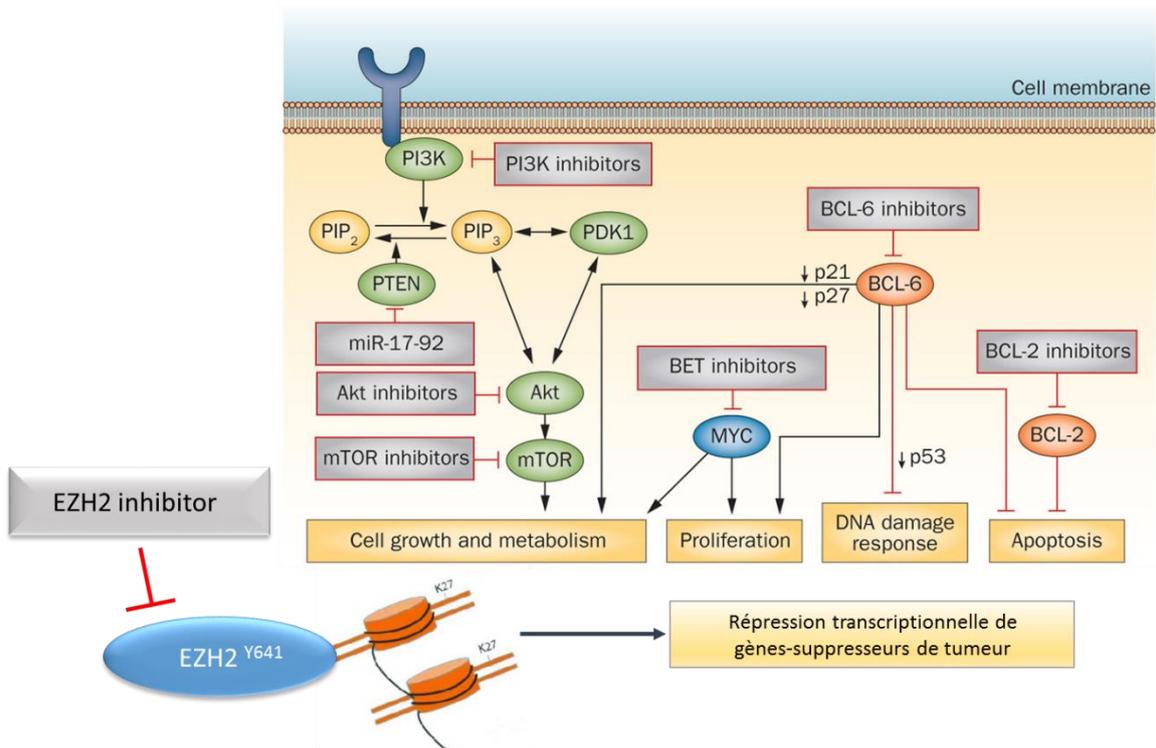
Nos résultats se rapprochent des données publiées par Kim puisqu'il n'a pas été observé de différence en survie entre les cas mutés et non mutés.

L'évaluation de l'impact pronostique de la mutation L265P du gène *MYD88* n'avait jamais été menée de façon prospective dans le LBDGC. Bien qu'aucune valeur pronostique n'ait été retenue dans notre étude, ces résultats viennent

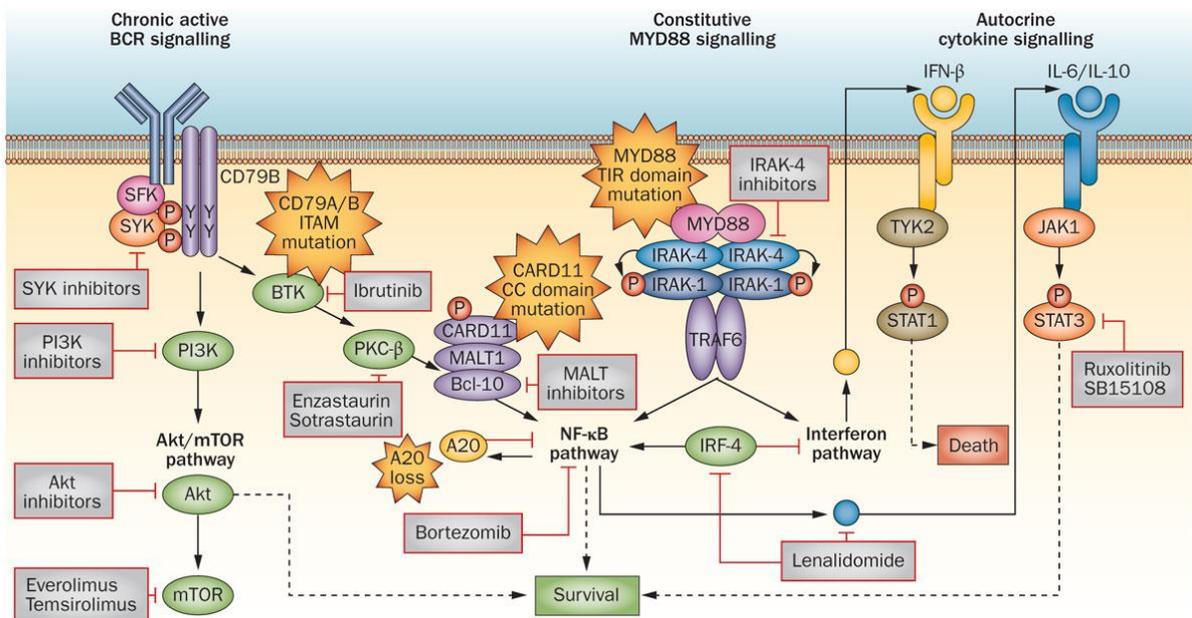
étoffer les données clinico-pathologiques publiées récemment. A l'issue de cette étude, la collection d'ADN extraits pourra permettre d'engager une étude plus large de détection par NGS de l'ensemble des mutations identifiées dans le LBDGC. La caractérisation fine de la maladie au diagnostic et de son profil évolutif en fonction de sa signature moléculaire apparaît comme un enjeu majeur dans le développement de thérapies ciblées.

## 6. PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES

La détermination de la COO en GEP et du profil mutationnel au diagnostic de LBDGC apparaissent comme primordiales pour les stratégies thérapeutiques futures. Le démantèlement des mécanismes oncogéniques « drivers » ou « passagers » dans les différents sous-types de LBDGC a conduit à repenser les traitements futurs. L'intégration d'inhibiteurs du protéasome (Bortezomib), d'inhibiteurs du BCR (Ibrutinib) ou d'agents immunomodulateurs comme le Lenalidomide en combinaison à la chimiothérapie dans le LBDGC de type ABC est en cours d'évaluation dans plusieurs essais. Dans le LBDGC de type GC, l'introduction de thérapies ciblant certains régulateurs épigénétiques comme les inhibiteurs d'EZH2 apparaît prometteuse. Les différentes voies de signalisation oncogéniques et les acteurs moléculaires-cibles pour ces deux sous-types sont présentés dans les **Figure 32** et **Figure 33**. Les thérapies ciblées en cours de développement y sont également mentionnées (49). Une homogénéisation des méthodes de détermination de la COO pour les essais de thérapies ciblées est absolument nécessaire, de même que pour l'utilisation future de ces dernières en pratique courante.



**Figure 32 : Voies de signalisation oncogéniques dans le LBDGC de type GC.** D'après Roschewski, Staudt et Wilson, Nature Reviews Clinical Oncology. 2014.11:12-23



**Figure 33 : Voies de signalisation oncogéniques dans le LBDGC de type ABC.** D'après Roschewski, Staudt et Wilson, Nature Reviews Clinical Oncology. 2014.11:12-23

## CONCLUSION

Chez les sujets jeunes ( $\leq 60$  ans) présentant un LBDGC non antérieurement traité de stade avancé, le pronostic des sous-types GC et NGC déterminés par l'algorithme de Hans était identique après traitement par RCHOP14 ou par chimiothérapie dite « intensive » comportant une autogreffe. De la même manière, indépendamment du bras de traitement, l'expression des protéines BCL2, MYC et leur coexpression ne modifiait pas le pronostic, tant en survie sans progression qu'en survie globale.

Notre étude a confirmé l'excellent pronostic du sous-type PMBL, en soulevant toutefois la problématique des faux-positifs en TEP.

Dans les essais cliniques futurs, la détermination de la COO doit reposer sur les nouvelles techniques de biologie moléculaire pour coller au plus près de la réalité oncogénique cellulaire et favoriser le développement de stratégies thérapeutiques personnalisées.

A l'instar de notre étude évaluant les caractéristiques cliniques et la valeur pronostique de la mutation *MYD88* L265P, la recherche de mutations somatiques permet d'améliorer la compréhension du rôle de ces événements oncogéniques. Au-delà de la visée nosologique, cette démarche aura un objectif théranostique certain dans un avenir proche à l'ère de la médecine individuelle.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Récher C, Coiffier B, Haioun C, Molina TJ, Fermé C, Casasnovas O, et al. Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2011;378(9806):1858-67.
2. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23(18):4117-26.
3. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Singh Gill D, Linch DC, Trneny M, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010;28(27):4184-90.
4. Milpied N, Deconinck E, Gaillard F, Delwail V, Foussard C, Berthou C, et al. Initial treatment of aggressive lymphoma with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell support. *N Engl J Med*. 2004;350(13):1287-95.
5. Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, Salles G, Coiffier B, Brice P, et al. Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of the prospective LNH87-2 protocol--a groupe d'Etude des lymphomes de l'Adulte study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2000;18(16):3025-30.
6. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*. 1993;329(14):987-94.
7. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007;109(5):1857-61.
8. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
9. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, et al. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015;33(26):2848-56.
10. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal Gene Signatures in Large-B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313-23.
11. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*. 2003;198(6):851-62.
12. Lenz G, Wright GW, Emre NCT, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(36):13520-5.

13. Rieger M, Osterborg A, Pettengell R, White D, Gill D, Walewski J, et al. Primary mediastinal B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: results of the Mabthera International Trial Group study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2011;22(3):664-70.
14. Shaffer AL, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:565-610.
15. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-82.
16. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011;29(2):200-7.
17. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012;30(28):3460-7.
18. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg M-L, Taskinen M, Berglund M, Amini R-M, et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2007;109(11):4930-5.
19. Fu K, Weisenburger DD, Choi WWL, Perry KD, Smith LM, Shi X, et al. Addition of Rituximab to Standard Chemotherapy Improves the Survival of Both the Germinal Center B-Cell–Like and Non–Germinal Center B-Cell–Like Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(28):4587-94.
20. Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd H-W, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2010;116(23):4916-25.
21. Salles G, de Jong D, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, et al. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood*. 2011;117(26):7070-8.
22. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet Lond Engl*. 2013;381(9880):1817-26.
23. Molina TJ, Canioni D, Copie-Bergman C, Recher C, Brière J, Haioun C, et al. Young patients with non-germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma benefit from intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab compared with CHOP plus rituximab: analysis of data from the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte/lymphoma study association phase III trial LNH 03-2B. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2014;32(35):3996-4003.
24. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009;15(17):5494-502.

25. Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, Ott G, Kosari F, Rosenwald A, et al. Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia*. 2008;22(12):2226-9.
26. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009;114(17):3533-7.
27. Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, Briere J, Delarue R, Canioni D, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood*. 2015; Epub. Ahead of print. Disponible sur <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-05-647602>.
28. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012;30(28):3452-9.
29. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88-92.
30. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470(7332):115-9.
31. Bohers E, Mareschal S, Bouzelfen A, Marchand V, Ruminy P, Maingonnat C, et al. Targetable activating mutations are very frequent in GCB and ABC diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(2):144-53.
32. Montesinos-Rongen M, Godlewska E, Brunn A, Wiestler OD, Siebert R, Deckert M. Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2011;122(6):791-2.
33. Pham-Ledard A, Cappellen D, Martinez F, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio J-P. MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol*. 2012;132(8):2118-20.
34. Kraan W, van Keimpema M, Horlings HM, Schilder-Tol EJM, Oud MECM, Noorduynd LA, et al. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in primary testicular diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2014;28(3):719-20.
35. Fernández-Rodríguez C, Bellosillo B, García-García M, Sánchez-González B, Gimeno E, Vela MC, et al. MYD88 (L265P) mutation is an independent prognostic factor for outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2014;28(10):2104-6.
36. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, Williams JN, Cohen JB, Flowers CR. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-cell lymphoma survival: a meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14(6):460-7.e2.
37. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzman T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011;117(18):4836-43.

38. Mareschal S, Bagacean C, Rainville V, Leroy K, Jais J-P, Varet H, et al. Accurate Classification Of GCB/ABC and MYC/BCL2 Diffuse Large B-Cell Lymphoma With a 14 Genes Expression Signature and a Simple and Robust RT-MLPA Assay. *Blood*. 2013;122(21):84-84.
39. Vassilakopoulos TP, Pangalis GA, Chatziioannou S, Papageorgiou S, Angelopoulou MK, Galani Z, et al. PET/CT in primary mediastinal large B-cell lymphoma responding to rituximab-CHOP: An analysis of 106 patients regarding prognostic significance and implications for subsequent radiotherapy. *Leukemia* [Internet]. 5 juin 2015 [cité 15 sept 2015]; Disponible sur: <http://www.nature.com/gate2.inist.fr/leu/journal/vaop/ncurrent/full/leu2015120a.html>
40. Vassilakopoulos TP, Pangalis GA, Katsigiannis A, Papageorgiou SG, Constantinou N, Terpos E, et al. Rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone with or without radiotherapy in primary mediastinal large B-cell lymphoma: the emerging standard of care. *The Oncologist*. 2012;17(2):239-49.
41. Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, Hegde U, Grant N, Steinberg SM, et al. Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(16):2717-24.
42. Morel P, Gaulard P, Gisselbrecht C, Ferme C, Salles G, Tilly H, et al. Autologous stem-cell transplantation as consolidation therapy for diffuse large B-cell lymphoma patients with overexpression of bcl-2 protein. Results of the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trial LNH98-B2. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2008;19(3):560-5.
43. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*. 2013;121(20):4021-31.
44. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TFE, Bernd H-W, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013;121(12):2253-63.
45. Kim Y, Ju H, Kim DH, Yoo HY, Kim SJ, Kim WS, et al. CD79B and MYD88 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol*. 2014;45(3):556-64.
46. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011;43(9):830-7.
47. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(10):3879-84.
48. Pham-Ledard A, Beylot-Barry M, Barbe C, Leduc M, Petrella T, Vergier B, et al. High Frequency and Clinical Prognostic Value of MYD88 L265P Mutation in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg-Type. *JAMA Dermatol*. 2014;150(11):1173-9.
49. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma—treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(1):12-23.

**Cell-Of-Origin (COO) classification, BCL2 and MYC protein expression, and MYD88 L265P mutation associated-outcomes in younger patients treated by RCHOP versus intensive regimen followed by autologous transplant front-line therapy for de novo advanced Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) : results of the french prospective multicenter randomized trial GOELAMS-075**

The prognostic value of COO classification by immunohistochemistry (IHC) for de novo untreated advanced DLBCL remains controversial after Rituximab-based frontline therapy. Other biomarkers such as BCL2 or MYC protein expression have been proposed to predict survival. MYD88 L265P mutational status had never been explored in a randomized trial. IHC characteristics and MYD88 L265P status were investigated.

Three hundred twenty-three patients (pts) younger than 60 years with de novo untreated advanced DLBCL were randomized in the french prospective multicenter trial GOELAMS-075 to receive either 8 courses of RCHOP14 (n=161) or 2 courses of RCEEP and 1 course of Rituximab-Methotrexate-Cytarabine (RMC) followed by intensive BEAM conditioning with autologous transplant (ASCT) (n=162) upon negative interim PET-CT (visual analysis). In case of positivity, salvage regimen followed by ASCT was applied. COO determination using Hans algorithm, BCL2 protein expression (50% and 70%) and MYC protein expression (40%) were recorded.

COO analysis could be performed for 88% of pts : 31% GC, 42% NGC and 27% PMBL, without treatment imbalance. There was no PFS or OS difference between GC and NGC subtypes (PFS: 67%±5% GC and 73%±4% NGC; OS: 75%±5% GC and 78%±4% NGC), whereas PMBL prognosis was significantly better (PFS: 88%±4%, HR=0,3; CI95% [0,14-0,71] p=0,01; OS: 96%±2% HR=0,15; CI95%[0,04-0,51] p=0,002). No further advantage of treatment was observed in all 3 COO subtypes. BCL2 and MYC protein expression (28% of coexpression cases), determined for 91% and 63% of cases respectively, did not impair prognosis, regardless of treatment arm. Positive MYD88 L265P mutation was observed in 7,8% cases (n=11/141), and was associated with advanced age, extranodal site, BCL2 and MYC protein overexpression, without any prognostic impact.

In younger patients, outcome of IHC defined GC and NGC subtype of non-PMBL DLBCL was not different following R-CHOP14 or intensive treatment including ASCT. Conversely, the good prognosis of PMBL subtype with excellent PFS and OS was confirmed. Regardless of treatment arm, BCL2 or MYC or both overexpression did not impair significantly the prognosis. No prognostic value of MYD88 L265P status was found. IHC defined COO or BCL2/MYC overexpression could not identify DLBCL in need of intensive therapy with ASCT.

## RESUME

L'impact pronostique de la cellule d'origine (COO), de l'expression des protéines BCL2 et MYC, et de la mutation L265P du gène *MYD88* au diagnostic a été évalué dans la cohorte de l'essai multicentrique GOELAMS-075 où 335 patients (pts) ≤60ans atteints de LBDGC de novo de stade avancé non traités ont été randomisés pour recevoir 8 cures de RCHOP ou un régime intensif suivi d'une intensification thérapeutique avec autogreffe.

La COO (Hans) et l'expression des protéines BCL2 (seuils 50% et 70%) et MYC (seuil 40%) ont été déterminées en IHC. La recherche de mutation *MYD88*-L265P a été réalisée en qPCR Taqman allèle-spécifique. Le critère principal de jugement était la PFS à 5 ans.

La COO a pu être déterminée pour 88% des pts : 31% GC, 42% NGC et 27% PMBL sans différence entre les 2 bras. Aucune différence n'était observée en PFS et en OS à 5 ans entre les cas GC et NGC (PFS: 67%±5% GC et 73%±4% NGC; OS: 75%±5% GC et 78%±4% NGC), le pronostic des cas PMBL était largement supérieur (PFS: 88%±4%, HR=0,3; IC95% [0,14-0,71] p=0,01; OS: 96%±2% HR=0,15; IC95%[0,04-0,51] p=0,002). Il n'existait pas de différence entre les 2 bras de traitement pour les 3 sous-types de COO analysés. L'expression des protéines BCL2 et MYC (dont 28% de cas coexpresseurs) déterminée dans 91% et 63% cas respectivement n'avait aucune valeur pronostique quel que soit le bras de traitement. La mutation *MYD88* L265P était retrouvée dans 7,8% des cas analysés (11/141) et était associée à un âge élevé, une atteinte extranodale, une surexpression des protéines BCL2 et MYC, sans différence en survie entre les cas mutés et non mutés.

Dans notre étude, le pronostic des sous-types GC et NGC était similaire, inférieur à celui des cas PMBL, sans différence en fonction du traitement. L'expression des protéines BCL2, MYC ou leur coexpression n'influençaient pas le pronostic. Il en était de même pour la mutation *MYD88* L265P.

**DISCIPLINE** : Hématologie

**MOTS-CLES** : Lymphome B diffus à grandes cellules, sujet jeune, cellule d'origine, algorithme de Hans, protéine BCL2, protéine MYC, mutation *MYD88* L265P, intensification thérapeutique.

**INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE** :  
UFR Bordeaux - Faculté de Médecine