

Prévalence, cinétique et valeur pronostique de la mutation XPO1 E571K dans le lymphome de Hodgkin

Vincent Camus

▶ **To cite this version:**

Vincent Camus. Prévalence, cinétique et valeur pronostique de la mutation XPO1 E571K dans le lymphome de Hodgkin. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01315780

HAL Id: dumas-01315780

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01315780

Submitted on 13 May 2016

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

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

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

ANNEE 2016 N°

THESE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

CAMUS Vincent

Né le 24/07/1987 à Saint-Cyr l'Ecole (78)

Présentée et soutenue publiquement le 29 avril 2016

Prévalence, cinétique et valeur pronostique de la mutation *XPO1* E571K dans le lymphome de Hodgkin

PRESIDENT DU JURY: Pr. TILLY Hervé

DIRECTEUR DE THESE: Pr. JARDIN Fabrice

MEMBRES DU JURY: Dr. STAMATOULLAS-BASTARD Aspasia

Pr. DAMAJ Gandhi Laurent

Pr. SABOURIN Jean-Christophe

ANNEE UNIVERSITAIRE 2015 - 2016

U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESSEURS : **Professeur Michel GUERBET**

Professeur Benoit VEBER

Professeur Pascal JOLY

Professeur Stéphane MARRET

I - **MEDECINE**

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric **ANSELME**	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle **AUQUIT AUCKBUR**	HCN	Chirurgie plastique
Mr Bruno **BACHY** *(surnombre jusque 01/11/15))*	HCN	Chirurgie pédiatrique
Mr Fabrice **BAUER**	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya **BEKRI**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques **BENICHOU**	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul **BESSOU**	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise **BEURET-BLANQUART**	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité
(surnombre)		
Mr Guy **BONMARCHAND** (*surnombre)*	HCN	Réanimation médicale
Mr Olivier **BOYER**	UFR	Immunologie
Mr François **CARON**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe **CHASSAGNE**	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent **COMPERE**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale

Mr Antoine **CUVELIER**	HB	Pneumologie
Mr Pierre **CZERNICHOW**	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas **DACHER**	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan **DARMONI**	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre **DECHELOTTE**	HCN	Nutrition
Mme Danièle **DEHESDIN** *(surnombre)*	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric **DI FIORE**	CB	Cancérologie
Mr Fabien **DOGUET**	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean **DOUCET**	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard **DUBRAY**	CB	Radiothérapie
Mr Philippe **DUCROTTE**	HCN	Hépato-gastro-entérologie
Mr Frank **DUJARDIN**	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice **DUPARC**	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric **DURAND**	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand **DUREUIL**	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène **ELTCHANINOFF**	HCN	Cardiologie
Mr Thierry **FREBOURG**	UFR	Génétique
Mr Pierre **FREGER**	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François **GEHANNO**	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel **GERARDIN**	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille **GERARDIN**	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel **GODIN** *(surnombre)*	HB	Néphrologie
M. Guillaume **GOURCEROL**	HCN	Physiologie
Mr Philippe **GRISE** *(surnombre)*	HCN	Urologie
Mr Dominique **GUERROT**	HCN	Néphrologie
Mr Olivier **GUILLIN**	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier **HANNEQUIN**	HCN	Neurologie
Mr Fabrice **JARDIN**	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie **JOLY**	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal **JOLY**	HCN	Dermato - Vénéréologie

Mme Annie **LAQUERRIERE**	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent **LAUDENBACH**	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël **LECHEVALLIER**	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé **LEFEBVRE**	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry **LEQUERRE**	HB	Rhumatologie
Mr Eric **LEREBOURS**	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie **LEROI**	HCN	Physiologie
Mr Hervé **LEVESQUE**	HB	Médecine interne
Mme Agnès **LIARD-ZMUDA**	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves **LITZLER**	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand **MACE**	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David **MALTETE**	HCN	Neurologie
Mr Christophe **MARGUET**	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle **MARIE**	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul **MARIE**	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc **MARPEAU**	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane **MARRET**	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique **MERLE**	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre **MICHEL**	HCN	Hépato-gastro-entérologie
Mr Jean-François **MUIR**	HB	Pneumologie
Mr Marc **MURAINE**	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe **MUSETTE**	HCN	Dermatologie - Vénéréologie
Mr Christophe **PEILLON**	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian **PFISTER**	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe **PLANTIER**	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier **PLISSONNIER**	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan **PREVOST**	HCN	Endocrinologie
Mr Bernard **PROUST**	HCN	Médecine légale
Mme Nathalie **RIVES**	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Jean-Christophe **RICHARD** *(détachement)*	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent **RICHARD**	UFR	Pharmacologie

Mr Horace **ROMAN**	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe **SABOURIN**	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume **SAVOYE**	HCN	Hépato-gastrologie
Mme Céline **SAVOYE–COLLET**	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale **SCHNEIDER**	HCN	Pédiatrie
Mr Michel **SCOTTE**	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne **TAMION**	HCN	Réanimation médicale
Mr Luc **THIBERVILLE**	HCN	Pneumologie
Mr Christian **THUILLEZ**	HB	Pharmacologie
Mr Hervé **TILLY**	CB	Hématologie et transfusion
Mr Olivier **TROST**	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale
Mr Jean-Jacques **TUECH**	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre **VANNIER**	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît **VEBER**	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre **VERA**	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric **VERIN**	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Eric **VERSPYCK**	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier **VITTECOQ**	HB	Rhumatologie
Mr Jacques **WEBER**	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle **BARBIER-FREBOURG**	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Jeremy **BELLIEN**	HCN	Pharmacologie
Mme Carole **BRASSE LAGNEL**	HCN	Biochimie
Mme Valérie **BRIDOUX HUYBRECHTS**	HCN	Chirurgie Digestive
Mr Gérard **BUCHONNET**	HCN	Hématologie
Mme Mireille **CASTANET**	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie **CHASTAN**	HCN	Physiologie
Mme Sophie **CLAEYSSENS**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire

Mr Moïse **COEFFIER**	HCN	Nutrition
Mr Stéphane **DERREY**	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel **ETIENNE**	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge **JACQUOT**	UFR	Immunologie
Mr Joël **LADNER**	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste **LATOUCHE**	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas **MOUREZ**	HCN	Bactériologie
Mme Muriel **QUILLARD**	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Mathieu **SALAUN**	HCN	Pneumologie
Mme Pascale **SAUGIER-VEBER**	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire **TOBENAS-DUJARDIN**	HCN	Anatomie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique **LANIEZ**	UFR	Anglais
Mr Thierry **WABLE**	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry **BESSON**	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques **BONNET**	Pharmacologie
Mr Roland **CAPRON** (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean **COSTENTIN** (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
Mr Loïc **FAVENNEC** (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre **GOULLE**	Toxicologie
Mr Michel **GUERBET**	Toxicologie
Mme Isabelle **LEROUX - NICOLLET**	Physiologie
Mme Christelle **MONTEIL**	Toxicologie
Mme Martine **PESTEL-CARON** (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth **SEGUIN**	Pharmacognosie
Mr Rémi **VARIN** (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie **VAUGEOIS**	Pharmacologie
Mr Philippe **VERITE**	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile **BARBOT**	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique **BOUCHER**	Pharmacologie
Mr Frédéric **BOUNOURE**	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam **CHAGRAOUI**	Physiologie
Mme Marie Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth **CHOSSON**	Botanique
Mme Cécile **CORBIERE**	Biochimie

Mr Eric **DITTMAR**	Biophysique
Mme Nathalie **DOURMAP**	Pharmacologie
Mme Isabelle **DUBUC**	Pharmacologie
Mr Abdelhakim **ELOMRI**	Pharmacognosie
Mr François **ESTOUR**	Chimie Organique
Mr Gilles **GARGALA** (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla **GHARBI**	Chimie analytique
Mme Marie-Laure **GROULT**	Botanique
Mr Hervé **HUE**	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia **LE GOFF**	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong **LU**	Biologie
Mme Sabine **MENAGER**	Chimie organique
Mr Mohamed **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mme Malika **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mme Christine **THARASSE**	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric **ZIEGLER**	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile **GUERARD-DETUNCQ**	Pharmacie officinale
Mr Jean-François **HOUIVET**	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde **GUERIN**	Anglais

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mr Jérémie **MARTINET**	Immunologie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mr Romy **RAZAKANDRAINIBE**	Parasitologie
Mr François **HALLOUARD**	Galénique
Mme Caroline **LAUGEL**	Chimie organique
Mr Souleymane **ABDOUL-AZIZ**	Biochimie

Mme Maïté **NIEPCERON**	Microbiologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile **BARBOT**	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry **BESSON**	Chimie thérapeutique
Mr Roland **CAPRON**	Biophysique
Mr Jean **CHASTANG**	Mathématiques
Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB**	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth **CHOSSON**	Botanique
Mr Jean-Jacques **BONNET**	Pharmacodynamie
Mme Isabelle **DUBUS**	Biochimie
Mr Loïc **FAVENNEC**	Parasitologie
Mr Michel **GUERBET**	Toxicologie
Mr François **ESTOUR**	Chimie organique
Mme Isabelle **LEROUX-NICOLLET**	Physiologie
Mme Martine **PESTEL-CARON**	Microbiologie
Mme Elisabeth **SEGUIN**	Pharmacognosie
Mr Mohamed **SKIBA**	Pharmacie galénique
Mr Philippe **VERITE**	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS-MÉDECIN GÉNÉRALISTE

Mr Jean-Loup **HERMIL**	UFR	Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE**	UFR	Médecine générale
Mr Philippe **NGUYEN THANH**	UFR	Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal **BOULET**	UFR	Médecine générale
Mme Elisabeth **MAUVIARD**	UFR	Médecine générale
Mme Lucille **PELLERIN**	UFR	Médecine générale
Mme Yveline **SEVRIN**	UFR	Médecine générale
Mme Marie Thérèse **THUEUX**	UFR	Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei **FETISSOV** (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul **MULDER** (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su **RUAN** (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil **ADRIOUCH** (med) (Unité Inserm 905)	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med) (UMR 1079**)**	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Carine **CLEREN** (phar)	Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline **GAILDRAT** (phar) (UMR 1079)	Génétique moléculaire humaine
Mr Nicolas **GUEROUT** (phar)	Chirurgie Expérimentale
Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric **PASQUET**	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle **TOURNIER** (phar)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique **DELAFONTAINE**

HCN - Hôpital Charles Nicolle ***HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME***

CB - Centre Henri Becquerel ***CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray***

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation ***SJ – Saint Julien Rouen***

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

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur TILLY, pour m'avoir fait le très grand honneur d'accepter de présider ce jury de thèse et plus globalement pour votre encadrement bienveillant durant mes années d'internat. Vous m'avez accepté comme interne en Hématologie alors que je m'étais au départ orienté vers l'Oncologie et je vous prie de trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur JARDIN, pour avoir accepté de diriger ce travail, m'avoir confié mon premier travail de recherche clinique et m'avoir encadré tout au long de ma formation d'interne en Hématologie et d'étudiant en Master 2. Je te remercie très sincèrement pour la confiance que tu m'as témoignée depuis le début de mon internat et de me permettre de continuer à me former auprès de toi.

A Madame le Docteur STAMATOULLAS-BASTARD, pour avoir accepté de juger ce travail, m'avoir fait partager ta passion de l'hématologie, m'avoir guidé, aidé et fait confiance durant toutes ces années d'internat. Je te prie de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour ton accompagnement, ta générosité et ton soutien.

A Monsieur le Professeur DAMAJ et Monsieur le Professeur SABOURIN, vous me faites l'honneur de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mon respect et de mes sincères remerciements.

A l'ensemble du Département d'Hématologie du Centre Henri Becquerel,

A Stéphane, pour ta confiance, ton encadrement et ta disponibilité.

A Nathalie, pour avoir accepté de diriger mon mémoire de DU d'Allogreffe, pour ton soutien et ton exigence au service de la prise en charge des patients.

A Pascal et Emilie pour votre enseignement, votre formation à l'hématologie et votre encadrement de tous les jours.

A Hélène pour ton énergie, ton dynamisme et ta bonne humeur au quotidien.

A Fabrice et Aspasia, encore une fois merci pour votre confiance et votre soutien.

A Nathalie C, Marie Laure et Carole pour votre disponibilité et vos conseils.

A Elisabeth, Emmanuelle, Evelyne, Sabine, Béatrice, Sophie et à toutes les équipes IDE, AS, ASH, Maryvonne et toutes les secrétaires du Département d'Hématologie, merci pour votre bonne humeur, votre engagement, votre bienveillance et votre dévouement.

A l'ensemble des équipes médicales et paramédicales avec qui j'ai eu la chance de travailler au cours de mon internat :

A tous mes anciens co-internes que j'ai rencontrés au cours de mes différents stages et qui ont contribué à ce qu'ils se passent dans la bonne humeur : Hela, Dyhia, Ioana, Camille, Sophie, Mathilde, Michael, Armonie, Laetitia, Marie, Emeline, Stéphanie, Florian, Maxime, Simon, Louise, Cécile.

A mes co-internes actuels d'Hématologie clinique, Marion, Imène, Bénédicte, Pierre, Daphné et à tous les internes d'Hématologie biologique.

A toute l'équipe du laboratoire de Génétique Oncologique du Centre Henri Becquerel, Mr Bastard, Dominique, Pascaline, Sandrine, Elodie, Laetitia, Mathieu, Mélissa, Anne Laure, Annie, Nathalie, Colas, Soizic, Céline, pour m'avoir accueilli aussi chaleureusement pendant près de 2 ans et pour m'avoir formé à la cytogénétique et la biologie moléculaire avec patience et pédagogie.

A toute l'équipe de l'unité INSERM U918, Phiphi, Vivi, Elodie, Florian, Sydney, Sylvain, Pierre-Julien, Philippe, Catherine, pour m'avoir formé à la recherche fondamentale, m'avoir accueilli aussi chaleureusement dans votre équipe, m'avoir transmis votre savoir avec patience et avoir été une ressource inestimable pour moi.

A Shirin, Ludivine, Julien et l'équipe du Pr Frebourg à l'unité INSERM 1079 pour leur accueil, leur disponibilité, leurs conseils et la formation à la PCR digitale qu'ils m'ont délivré.

A toute l'équipe du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du Centre Henri Becquerel qui m'accueille actuellement, je remercie en particulier Mr Picquenot, Liana, Anca et Marie C.

A toute l'équipe de Pneumologie du Centre Hospitalier d'Elbeuf, Pierre-Alexandre, Colette, Mahdi, Laurence, pour m'avoir accueilli, transmis votre savoir et pour votre bonne humeur. Un remerciement particulier à Mme Vincent pour votre humour et nos improbables discussions. Je remercie également toute l'équipe des Urgences d'Elbeuf pour leur accueil et les bons moments passés en garde.

A toute l'équipe du service d'Oncologie du Centre Henri Becquerel, Dr Veyret, Dr Tennevet, Dr Clatot, Dr Petrau, Dr Alexandru, Dr Moldovan, Dr Adriouch, Dr Guillemet, Pr

Di Fiore, Dr Leheurteur, Dr Gouerant, Dr Thery, Dr Rigal. Merci beaucoup à Sylvie C. pour sa bienveillance, ainsi que Christine, Pascale et Frédérique.

A tous les biologistes et tous les techniciens du Laboratoire d'Hématologie du Dr Lenormand au CHU de Rouen, pour leur accueil et leurs enseignements. Je remercie en particulier Marie-Paule et Gérard pour m'avoir appris à lire un myélogramme ainsi que Catherine et M. Lenormand pour m'avoir enseigné la cytométrie en flux.

A Mme le Pr. Sylvie Castaigne et à toute l'équipe du service d'Hémato-Oncologie du Centre Hospitalier de Versailles, chez qui j'ai été initié à l'Hématologie dès le tout début de mes études de médecine.

Aux Docteurs Jacques Doll, Philippe Colardelle, Kamel Benghalia et Sylvie Roussin-Bretagne, pour m'avoir accueilli il y a plusieurs années en tant que FFI dans votre service au Centre Hospitalier de Versailles et pour votre confiance, même si vous n'avez pas réussi à me convertir à la gastro-entérologie.

A Marie Thérèse D. pour tous les bons moments passés au laboratoire de Biologie du Centre Hospitalier de Versailles et en dehors, et plus globalement merci à toute l'équipe de ce laboratoire, pour m'avoir accueilli et initié à la Biologie dès le début de mes études.

A tous mes anciens collègues IDE et AS de nuit du Centre Hospitalier de Versailles, en particulier Martine R et Patricia, j'ai passé avec vous de nombreuses nuits de travail en tant qu'infirmier remplaçant en parallèle de mes études de médecine, et les bons moments partagés avec vous, malgré l'immense charge de travail, resteront à jamais gravés dans ma mémoire.

A Mme le Professeur Nathalie Brion pour son soutien et sa disponibilité, et à tous les enseignants de la faculté de médecine Paris IDF Ouest pour la formation exigeante qu'ils m'ont apportée.

Aux Docteurs Stern, Luciani et Chemouni, pour leur accueil chaleureux dans leurs cabinets respectifs.

A mes anciens professeurs de Classe Préparatoire aux Grandes Ecoles du Lycée Hoche de Versailles, pour leurs enseignements solides qui m'ont permis ensuite de décrocher le concours de première année de médecine.

A Anne-Lise et Aurélie, pour m'avoir débauché de l'Oncologie en me transmettant leur passion de l'Hématologie et leur bonne humeur à toute épreuve. Je n'oublierai jamais ce semestre en Hématologie à vos côtés qui a conduit à ce que je rejoigne votre discipline.

A Laureline, la première interne que j'ai rencontrée lors de mon arrivée dans le service d'Oncologie de Becquerel et qui est devenue une amie précieuse. Merci pour ta franchise, ton humour et tous ces bons moments passés à Becquerel et ailleurs.

A Ophélie, pour sa bonne humeur contagieuse, sa joie de vivre et son dynamisme au quotidien. Je regrette de ne plus t'avoir à mes côtés à Becquerel.

A Maximilien et Amandine pour leur amitié précieuse et leur soutien sans faille.

A mes amis, Clotilde, Emmanuelle, Nelly, Vero, Kevin, nous avons traversés ensemble toutes ces années de médecine et je sais que je pourrais toujours compter sur vous.

A Sylvain, pour tout le travail que tu as fourni autour du manuscrit original né de cette étude, pour ta relecture attentive de cette thèse, pour ta rigueur, ton talent, ta disponibilité et tous ces moments partagés dans l'Open Space des étudiants de l'U918.

A Sydney, pour ta bonne humeur, tes nombreuses et si précieuses relectures de mes manuscrits. C'était une chance et un privilège immense que de partager ce fameux bureau avec toi durant ces deux années.

A ma famille, mes grands parents, à mon frère Alexandre, mes sœurs Christelle et Axelle, mon oncle Alain, à leurs conjoints et enfants ainsi qu'à tous mes cousins, oncles, tantes, merci de m'avoir soutenu dans mes choix et d'avoir été là pour moi durant ces très longues années d'étude.

A Martine et Jean Pierre, pour votre soutien indéfectible, votre aide et votre générosité, vous me suivez depuis le début, vous avez toujours cru en mois et respecté tous mes choix, je vous en serai toujours reconnaissant.

A ma mère, sans qui je ne serai jamais devenu médecin, qui m'a transmis sa passion pour ce beau métier et m'a soutenu avec force depuis le début de mes études. C'est grâce à toi si j'en suis là aujourd'hui, je t'en remercie du fond du cœur et j'espère avoir été à la hauteur de tes attentes.

Sommaire

GLOSSAIRE 21
INTRODUCTION 22
Présentation générale du lymphome de Hodgkin 22
Prise en charge thérapeutique du LHc 23
Caractéristiques histologiques et génétiques du LHc 24
La mutation *XPO1* E571K 25
Principes de la technologie de PCR digitale 28
PATIENTS ET METHODES 30
Patients et échantillons 30
Extraction d'ADN 31
Techniques de PCR digitale 31
Séquençage sur Ion torrent personal genome machine™ (PGM) 35
Evaluation de la réponse au traitement et TEP-FDG 36
Analyse statistique 36
RESULTATS 37
Mutations d'*XPO1* dans le LHc au moment du diagnostic initial 37
Analyse du taux de réponse et de la survie 43
Analyse de lignées cellulaires de Hodgkin 45
Intérêt de l'ADN plasmatique dans le suivi de la maladie résiduelle (MRD) 46
DISCUSSION 52
ANNEXES 59
Annexe 1 – Stades de Ann Arbor 59
Annexe 2 – Index pronostiques dans le lymphome de Hodgkin classique 60
Annexe 3 - Echelle de Deauville 5 points 61
Annexe 4 : Critères de réponse modifiés IHP 2007 (45) 62
Annexe 5 – Caryotype des 94 patients inclus dans l'étude 63
Annexe 6 – Résultats détaillés de PCR digitale pour les 94 patients 67
Annexe 7 – Manuscrit publié présentant la méthode de PCR digitale 70
Annexe 8 – Manuscrit original, en révision dans la revue *Haematologica* 79
BIBLIOGRAPHIE 102

GLOSSAIRE

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNp : ADN plasmatique

CR : Réponse complète

FACS : Fluorescence-activated cell sorting

FDG : ^{18}fluorodeoxyglucose

FFPE : Formalin-fixed, paraffin-embedded : tissu fixé dans le formol et inclus en paraffine

HRS: Cellules de Hodgkin et de Reed-Sternberg

IHP: International Harmonization Project

IRB: Institutional Review Board

IPS: International Prognostic Score

IWG: International Workshop Group

LHc : Lymphome de Hodgkin classique

LLC: Leucémie Lymphoïde Chronique

LYSA: LYmphoma Study Association

NGS: Next-Generation Sequencing

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

OS: Survie globale

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCRd: PCR digitale

PD: Maladie en progression

PMBL: Lymphomes B diffus primitifs du médiastin

PFS: Survie sans progression

PR: Réponse partielle

SD: Maladie Stable

SINE: Inhibiteurs Sélectifs d'Export Nucléaire

TEP: Tomographie par émission de positons

XPO1: Exportin-1

INTRODUCTION

Présentation générale du lymphome de Hodgkin

Le lymphome de Hodgkin (LH) est un des lymphomes les plus fréquents et représente environ 10% des nouveaux cas de lymphomes diagnostiqués dans le monde et 1% de l'ensemble des cancers, avec une incidence annuelle d'environ 3 cas pour 100 000 habitants dans les pays occidentaux (1), responsable d'une mortalité de 0,7 pour 100 000 habitants par an. Le lymphome de Hodgkin est une affection néoplasique du tissu lymphoïde divisée en deux entités selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2) : (i) le lymphome de Hodgkin classique (LHc) représentant 95% de l'ensemble des cas de LH ; (ii) le lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire, encore appelé « paragranulome de Poppema et Lennert », qui constitue une affection rare dont les caractéristiques cliniques, histologiques et cytogénétiques diffèrent du LHc (2). La majorité des cas de LHc sont diagnostiqués chez des patients âgés de 20 à 30 ans, avec un second pic d'incidence chez les adultes âgés de plus de 55 ans (3,4). Histologiquement, le LHc est divisé en 4 sous-types selon la classification de Lukes-Rye de 1966:

- Type 1 : prédominance lymphocytaire : concernant moins de 10% des cas et touchant plus particulièrement les sujets jeunes, avec un pronostic favorable.
- Type 2 : scléro-nodulaire : sous-type le plus fréquent, représentant 60% des cas de LHc avec une atteinte médiastinale souvent rapportée.
- Type 3 : cellularité mixte, concernant 30% des cas de LHc, avec une atteinte sous-diaphragmatique et splénique plus fréquente.
- Type 4 : déplétion lymphocytaire, affectant moins de 5% des cas, essentiellement des sujets âgés, avec un pronostic défavorable.

Prise en charge thérapeutique du LHc

Le LHc est un des cancers les plus curables et les patients ont largement bénéficié ces deux dernières décennies des combinaisons de chimiothérapie et de l'amélioration des techniques de radiothérapie, ayant permis d'obtenir des probabilités de survie sans maladie à 5 ans comprises entre 65% et 90% selon le stade et les facteurs de risque (5,6). Le classement en stades d'après la classification de Ann-Arbor modifiée selon Costwolds (7), présentée en Annexe 1, est complété par l'évaluation des facteurs pronostiques, permettant ainsi de définir des groupes thérapeutiques (Annexe 2). Une chimiothérapie par le protocole ABVD (doxorubicine, bléomycine, vincristine, dacarbazine), défini comme le standard international (8), est utilisée en début de traitement dans toutes les formes de LHc de l'adulte. Dans les stades localisés sus-diaphragmatiques, le traitement de référence est une association de chimiothérapie et irradiation des territoires ganglionnaires initialement atteints. La chimiothérapie exclusive est par contre le traitement standard des stades disséminés. Le schéma allemand BEACOPP (bléomycine, etoposide, doxorubicine, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, prednisone)(9) permet d'obtenir de meilleurs taux de réponse que l'ABVD mais sans différence de survie, en raison de la toxicité hématologique immédiate et à long terme, avec risque augmenté de myélodysplasie, de leucémie aigüe et des problèmes d'infertilité. L'analyse intermédiaire récente de l'étude randomisée AHL 2011, portant sur 782 patients, qui évaluait l'efficacité de la chimiothérapie par une tomographie par émission de positrons (TEP) précoce à deux cycles, dans le but de désescalader la chimiothérapie du BEACOPP vers l'ABVD, a retrouvé une survie sans progression (SSP) et une survie globale (SG) identiques dans les deux groupes de patients, avec une toxicité de grade 3 ou plus (hématologique, neutropénie fébrile et sepsis) supérieure chez les patients recevant 6 cures de BEACOPP. Le taux de TEP2 positif était de 13% des patients, similaire dans les deux

bras de traitement. Nous avons ainsi la confirmation que les patients avec une réponse rapide initiale à la chimiothérapie, c'est-à-dire une négativité de la TEP selon les critères de Deauville (10) après deux cures de chimiothérapie, ont un pronostic plus favorable et peuvent bénéficier d'une désescalade d'intensité de dose de chimiothérapie permettant une réduction de la toxicité chimio-induite (11–14). Néanmoins, environ 20 à 25% des patients atteints de LHc rechuteront au cours de leur suivi, soit de manière précoce (dans les 12 mois après la 1ère ligne de traitement), soit de façon tardive (plus de 12 mois après la 1ère ligne de traitement), ou seront considérés comme « primo réfractaires » (avec une réévolutivité du LHc en cours ou dans les 3 mois suivants une polychimiothérapie à base de doxorubicine) (15,16), ce qui souligne la nécessité de mieux comprendre les mécanismes génétiques sous-jacents impliqués dans ces rechutes et d'identifier des biomarqueurs prédictifs.

Caractéristiques histologiques et génétiques du LHc

Sur le plan histologique, le LHc n'est pas histologiquement monomorphe, à la différence de la plupart des cancers, et se caractérise par la présence de cellules mononuclées appelées cellules de Hodgkin et de cellules plurinucléées appelées cellules de Reed Sternberg (HRS). La singularité du LHc est marquée par le fait que les cellules tumorales (HRS) ne représentent que 0,1-2% des cellules présentes dans la tumeur (17,18). La rareté de ces cellules HRS, entourées par un important infiltrat inflammatoire, rend extrêmement difficile leur analyse moléculaire par les techniques classiques de séquençage ADN et explique le manque de connaissance actuelle du panorama génomique des LHc.

L'activation constitutive de la voie de signalisation NF-κB dans les cellules HRS a été précédemment démontrée par des techniques complexes de capture des HRS par micro-dissection laser (19,20) ou par tri cellulaire à l'aide de la cytométrie en flux (FACS) (21).

Des amplifications géniques de *REL*, gène codant pour un facteur de transcription de la voie NF-κB, ont été décrites dans environ 30% des cas de LHc (22,23) et des mutations du gène de la β-2-microglobuline sont fréquemment retrouvées chez des patients porteurs d'un LHc scléro-nodulaire, avec un pronostic plus favorable (21).

La mutation *XPO1* E571K

Nous avons récemment mis en évidence dans une série de patients atteints de lymphomes B diffus primitifs du médiastin (PMBL), inclus dans le programme d'essai clinique du LYSA « LNH03 » (24,25), une mutation récurrente du gène de l'exportine-1 (*XPO1*, aussi appelée « Chromosome Region Maintenance 1 » [*CRM1*]) localisée au niveau de l'exon 15 du gène. Cette mutation est de type substitution non-synonyme (c.1711G>A), entrainant un changement d'une Glutamine (E) en position 571 pour une Lysine (K) (p.E571K). Les PMBL sont un groupe particulier de lymphomes agressifs, qui partagent de nombreuses caractéristiques génétiques avec les LHc, telles que les mutations des gènes *SOCS1*, *STAT6* (26) et *PTPN1* (27). XPO1 (**Figure 1**) est une protéine membre de la superfamille des importines-β (aussi appelées « Karyophérines »), récepteurs d'export nucléaire responsables de la translocation du noyau vers le cytoplasme de nombreux ARN et protéines régulatrices du cycle cellulaire, y compris des facteurs de transcription codés par des gènes suppresseurs de tumeurs, telles que *p53*, *BRCA1*, *NPM*, *APC*, *FOXO* et la Survivine. XPO1 se lie aux protéines à exporter hors du noyau via leur court domaine riche en acides aminés de type leucine constituant un signal d'export nucléaire (« leucine-rich » Nuclear Export Signal [NES]) avec fixation de la protéine « cargo » dans le sillon hydrophobe d'XPO1 (28–30) et passage de ce complexe à travers le pore nucléaire via un mécanisme GTP-dépendant impliquant la GTPase *Ran*. En plus de son implication dans le transport nucléo-cytoplasmique, XPO1 joue également un rôle dans la duplication du

centrosome et le contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (31).

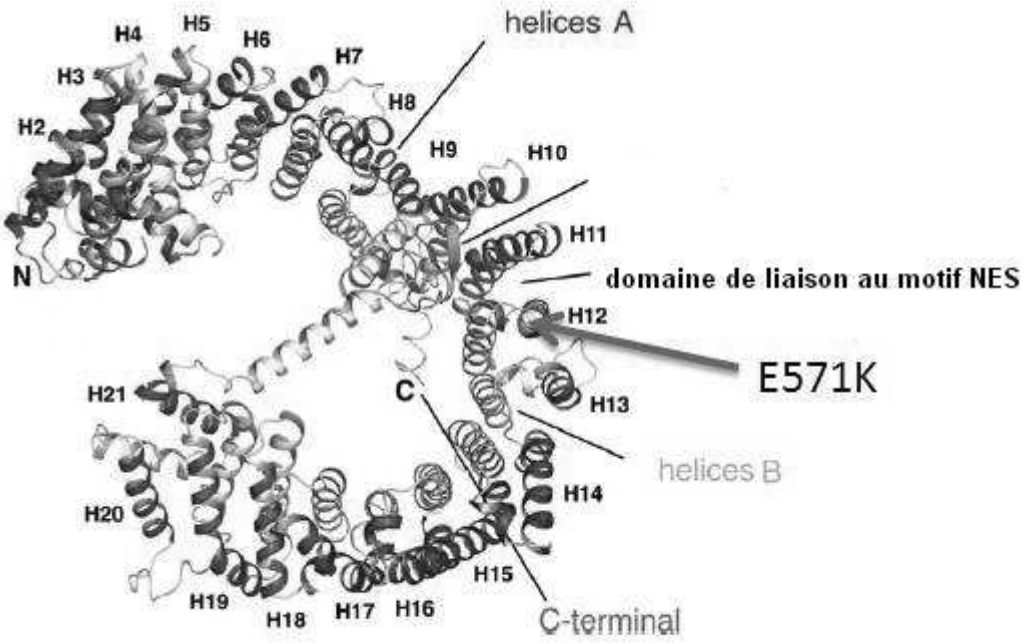


Figure 1 : Structure tridimensionnelle de la protéine exportine-1 (*XPO1*/CRM1). Représentation du résidu acide glutamique en position 571 au niveau du sillon hydrophobe (hélice alpha H12) jouant un rôle dans la fonction cargo de la protéine et sa liaison aux motifs NES. Ce résidu acide glutamique est substitué pour une lysine en cas de mutation *XPO1* E571K. D'après (32)**.**

Les substitutions nucléotidiques (mutations ponctuelles faux-sens) affectant le gène d'*XPO1* ont également été rapportées à de faibles fréquences dans les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) (33) et les cancers épidermoïdes de l'œsophage (ESCC)(34), ce qui suggère que ces mutations pourraient avoir un rôle crucial dans différents processus oncogéniques (27,35). Les inhibiteurs sélectifs de l'export nucléaire (SINE) sont une nouvelle classe de petites molécules inhibitrices capables de cibler *XPO1* (**Figure 2**) et de provoquer la rétention de différents suppresseurs de tumeurs dans le

noyau avec ainsi une activité anti-oncogénique dont l'intérêt est actuellement à l'étude dans différents essais de phase I et II dans plusieurs hémopathies malignes (36,37).

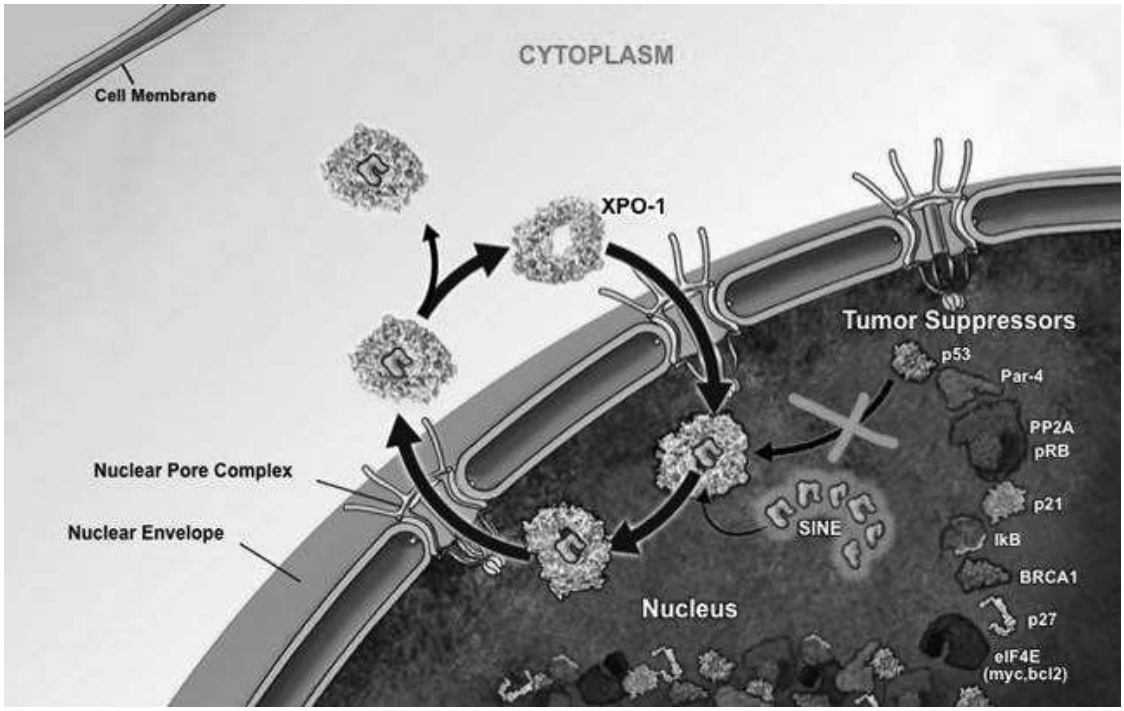


Figure 2 : Mécanisme d'action des inhibiteurs ciblés de l'export nucléaire (SINE). Le KPT-185 et le KPT-330 sont capables d'inhiber spécifiquement la protéine XPO1 , d'après (38)

La mutation *XPO1* E571K a été détectée dans approximativement 25% des cas de PMBL ainsi qu'à une fréquence de 10% dans des cellules HRS triées par cytométrie en flux (21). En raison de la rareté des cellules tumorales HRS dans le LHc, représentant moins de 1% de la tumeur (17,18) avec un infiltrat réactionnel inflammatoire largement prédominant, les analyses génomiques sont rendues très difficiles et les caractéristiques moléculaires de ces lymphomes sont encore largement inconnues. L'analyse de l'ADN tumoral libre circulant dans le plasma des patients pourrait permettre de caractériser la maladie sur le plan moléculaire, avec moins d'hétérogénéité que la biopsie diagnostique (39). Ce concept de « biopsie liquide » a récemment été démontré dans les Lymphomes B diffus à Grandes Cellules (40) avec détection d'un panel de mutations récurrentes dans l'ADN extrait de tumeurs et de plasma de patients (Lymphopanel). L'ADN tumoral circulant extrait du

plasma (ADNp) est également détectable chez les patients atteints de LHc (41,42) ce qui indique que le concept de "biopsie liquide" est également applicable et pertinent dans cette pathologie. Nous avons récemment mis au point une technique hautement sensible et spécifique de PCR digitale (PCRd) basée sur des sondes spécifiques oligonucléotidiques permettant la détection de la mutation somatique *XPO1* E571K dans l'ADNp (43). Cette technique peut également être utilisée pour détecter la maladie résiduelle (MRD) à partir de l'ADNp.

Principes de la technologie de PCR digitale

Le principe de la PCRd consiste à partitionner un échantillon d'ADN en des milliers de compartiments distincts (**Figure 3**). Certains compartiments (micro-puits ou gouttelettes en émulsion) seront vides tandis que d'autres contiendront la cible d'ADN recherchée. Ensuite, dans chaque compartiment, une réaction de PCR s'effectue avec les amorces et sondes d'intérêt. Après la PCR, si la séquence ADN recherchée est présente, un fort signal de fluorescence est émis et mesuré par l'appareil. Si la séquence cible n'est pas présente dans le compartiment, seule une fluorescence basale de bruit de fond sera émise. Le lecteur de PCR digitale est ensuite capable d'analyser chaque compartiment et de comptabiliser le nombre de réactions positives et négatives. Le ratio de réactions positives par rapport aux réactions négatives est appliqué à la loi de Poisson (loi des petits nombres) et permet une quantification précise du nombre de molécules d'ADN mutées ou non dans l'échantillon de départ, sans nécessité d'une « gamme » ou courbe standard. La partition de l'échantillon en milliers de compartiments permet également d'obtenir une excellente sensibilité de la technique. En effet, si une cible d'ADN rare est présente dans l'échantillon initial, elle n'apparaitra que dans un ou deux compartiments. Dans ce compartiment, cette cible ADN ne sera pas en compétition avec des milliers de séquences

similaires, ce qui permettra à la cible d'intérêt de dégager une fluorescence en fin de PCR et d'être détectée par le lecteur.

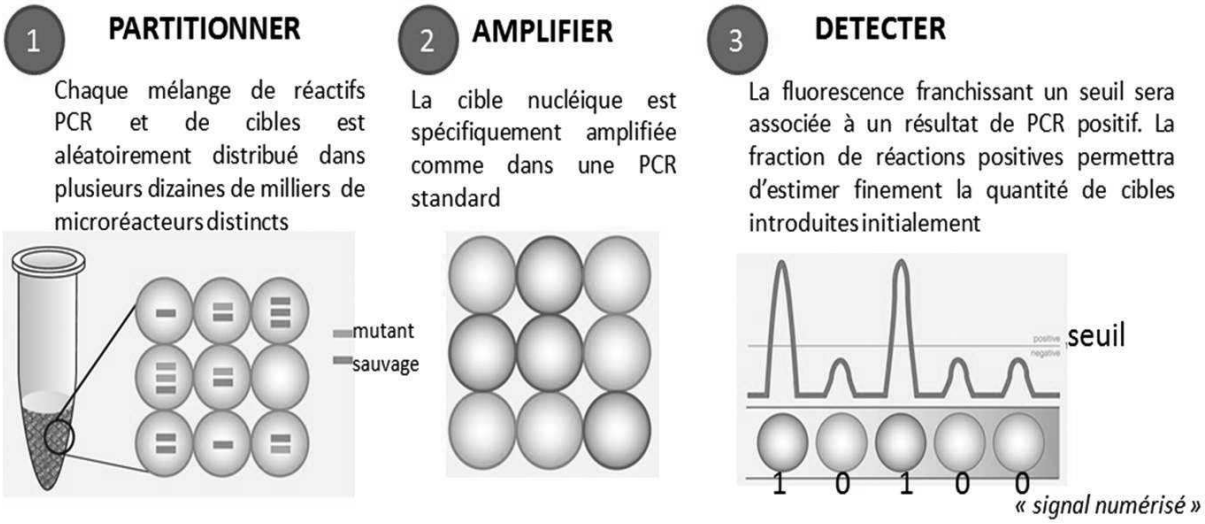


Figure 3 : Principe de la PCR digitale en « gouttelettes » (Qx200, BIO-RAD Technologies)

L'étude rétrospective rapportée ici porte donc sur une cohorte de patients présentant un LHc en première ligne de traitement et décrit la prévalence, la cinétique et la valeur pronostique de la mutation *XPO1* E571K. Il s'agit de la première étude rapportant la détectabilité de cette mutation dans le plasma et la tumeur de patients atteints de LHc et évaluant la pertinence et l'intérêt du suivi de cette mutation dans l'ADNp en tant qu'outil de détection de la MRD. Nous démontrons que cette mutation d'*XPO1* est un nouveau biomarqueur génétique du LHc, utile à la fois au diagnostic et dans le suivi de la maladie.

PATIENTS ET METHODES

Patients et échantillons

Ont été inclus dans cette étude rétrospective tous les patients adultes présentant un LHc diagnostiqués entre 2009 et 2015 au Centre Henri Becquerel de Rouen pour lesquels du matériel ADN extrait de tissu cryopréservé ou conservé en paraffine (FFPE) était disponible. Les patients étaient inclus si nous disposions des données cliniques de stadification de la maladie ainsi que des données d'imagerie notamment de tomographie par émission de positons au ^{18}fluorodeoxyglucose (TEP-FDG). Nous avons ainsi inclus 94 patients dans la présente étude, représentant 81 ADN cryopréservés et 13 ADN extraits de tissus FFPE. Tous les patients avaient été diagnostiqués porteurs d'un LHc selon la classification OMS 2008 après relecture des lames de biopsies tumorales par deux hémopathologistes expérimentés, et les sous-types de LHc étaient précisés selon les critères histologiques usuels. Parmi les 94 patients sélectionnés, 50 d'entre eux avaient été précédemment inclus dans une étude biologique prospective observationnelle monocentrique (étude « Cytokines », N°RCB 2009-A01117-50) visant à analyser la cinétique d'évolution de différentes cytokines plasmatiques au cours du traitement du LHc. Ces 50 patients (cohorte « Cytokines ») ont été inclus dans cette précédente étude entre 2010 et 2012 et avaient bénéficié de prélèvements sériés de plasma EDTA, obtenus à partir de prises de sang régulières, concomitantes notamment de la biopsie diagnostique et de la fin du traitement de radiothérapie et chimiothérapie. Tous les patients avaient donné leur consentement éclairé pour la collection des échantillons histologiques, des données cliniques ainsi que l'analyse de biomarqueurs.

L'étude a été approuvée par l'IRB (Institutional Review Board) du Centre Henri Becquerel, sous le numéro d'enregistrement N°1601B.

Extraction d'ADN

Les échantillons de sang ont été prélevés sur des tubes EDTA de 10mL et centrifugés dans les deux heures après la prise de sang, à 2,000g pendant 10 minutes (à 4°C) afin d'isoler le plasma, qui fut ensuite conservé à -80°C. L'ADN a ensuite été extrait à partir d'aliquots de 1-3mL de plasma EDTA à l'aide du QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit® (Qiagen, Hilden, Allemagne) en suivant les instructions du fournisseur. L'ADN plasmatique (ADNp) extrait de chaque échantillon de plasma a été élué dans 40µL de tampon AVE et conservé à -80°C. L'ADN double-brin extrait a ensuite été quantifié à l'aide du Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, Etats-Unis). Concernant les échantillons biopsiques, l'ADN génomique a été extrait des noyaux cellulaires selon les méthodes classiques de digestion des membranes à la protéinase K, purification au Chlorure de Sodium et précipitation à l'alcool. Pour l'extraction d'ADN FFPE, les lames ont été systématiquement revues par un hémopathologiste qualifié afin de sélectionner la zone tumorale du bloc de paraffine à extraire à l'aide d'un kit dédié (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, QIAGEN®). Les ADN génomiques ont été conservés à -20°C dans une solution tampon contenant 10mM de Tris-Cl et 1mM d'EDTA (pH 8) (TE 10 :1).

Techniques de PCR digitale

Le manuscrit décrivant la technique de PCR digitale pour la détection de la mutation *XPO1* E571K que nous avons précédemment publié est présenté en **annexe 7**. Brièvement, une première technique de PCR digitale (PCRd) utilisant des puces spécifiques (QuantStudio3D® Digital PCR system; Life Technologies, Carlsbad, CA,

Etats-Unis) a été utilisée pour la détection de mutation dans les échantillons ADN des patients. L'analyse du statut mutationnel dans l'échantillon ADN par PCRd est basée sur une technique utilisant des sondes d'hydrolyse oligonucléotidiques TaqMan®-MGB spécifiques de la mutation *XPO1* E571K. Le principe de la sonde TaqMan® repose sur l'activité exonucléase 5´–3´ de la Taq polymérase qui clive une sonde marquée lors de son hybridation à la séquence complémentaire permettant l'émission d'une fluorescence mesurable. Les expériences de PCRd ont été effectuées sur l'ADN extrait de tissu tumoral cryopréservé ou FFPE, ainsi que sur l'ADNp obtenu au moment du diagnostic (avant tout traitement) ainsi qu'en fin de traitement.

Les séquences nucléotidiques de nos sondes TaqMan®-MGB ainsi que des amorces de PCR, choisies pour amplifier la région de l'exon 15 du gène *XPO1* sur chromosome 2 où est située la mutation E571K, étaient les suivantes :

Amorce sens (F): TCTCTAACAAGACAAAAACATTCATTTATTTTCTTCA

Amorce anti sens (R) : GCTCACTGGAAATTTCTGAAGACTGT

Sonde sauvage avec fluorochrome VIC : AGCTGTTCGAATTCAT

Sonde mutée avec fluorochrome FAM : AGCTGTTC**A**AATTCAT

En raison de la quantité limitée d'ADNp disponible, nous avons réalisé une étape de pré-amplification de 4ng d'ADNp. Cette étape a été effectuée dans un volume final de réaction de 25µL comportant 12,5µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (sans uracile N-glycosylase), 10,25µL d'eau stérile et 0,25µL d' « Assay » spécifique de la mutation *XPO1* E571K (composé de l'ensemble des primers et sondes TaqMan®-MGB). Le programme de pré-amplification comportait les étapes suivantes : 1 cycle à 95°C pendant 10 minutes, puis 12 cycles de 95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 4

minutes. Les produits de pré-amplification ont ensuite été dilués au 1 :5 dans du TE 10 :1 et par la suite traités comme des échantillons standards pour la PCR digitale. Dans chaque expérience, de l'ADN génomique normal (Promega® Corporation, Madison WI) et de l'ADN normal pré-amplifié étaient utilisés comme témoins négatifs en PCRd. QuantStudio3D® est un appareil de PCR digitale permettant de partitionner un échantillon d'ADN dans 20.000 puits individuels à l'échelle nanométrique sur une puce dédiée. La réaction de PCR digitale a été réalisée dans 15µL de volume final comportant : 7,5µL de tampon MasterMix® digital PCR 20x (Life Technologies), 0,75µL d'Assay spécifique de la mutation (amorces et sondes TaqMan®) et 6,75µL d'échantillon d'ADN (soit 6,75µL de produit de pré-amplification dilué dans du TE 10 :1 pour l'ADN plasmatique, soit 20ng d'ADN génomique FFPE ou cryopréservé non pré-amplifié dilué dans du TE 10 :1 pour un volume total de 6,75µL). Le volume final de 15µL de chaque échantillon a ensuite été chargé sur une puce de PCR digitale par échantillon à l'aide du QuantStudio® 3D digital PCR Chip Loader® selon les recommandations du fabricant, puis les puces placées dans l'appareil de PCR digitale Gene Amp® PCR System 9700 afin de réaliser l'amplification. La réaction de PCR était constituée des étapes suivantes : 1 cycle à 96°C pendant 10 minutes, puis 39 cycles de 55°C pendant 2 minutes et 98°C pendant 30 secondes, puis un cycle à 60°C pendant 2 minutes. L'amplification se déroule dans chaque puits, et la puce est ensuite soumise à la lecture de fluorescence post PCR. Les données brutes de fluorescence étaient ensuite transmises sur le logiciel d'analyse dédié, QuantStudio® 3D Analysis Software (Life Technologies) pour l'interprétation des données. Chaque puits est classé comme positif ou négatif sur la base du signal de fluorescence émis qui est utilisé pour déterminer l'existence de la séquence d'ADN d'intérêt mutée ou sauvage dans le puits. Chaque puits est ainsi classé de la façon suivante : FAM-/VIC- (apparaissant en couleur jaune) pour un puits ne contenant pas la séquence d'intérêt (absence

d'amplification), FAM+/VIC- correspondant à la séquence mutée (couleur bleue), FAM-/VIC+ correspondant à la séquence sauvage (couleur rouge), FAM+/VIC+ (apparaissant en vert) lorsque le puits contient à la fois la séquence mutée et la séquence sauvage. Chaque graphe de fluorescence, pour chaque échantillon, a été revu et interprété manuellement (avec ajustement et correction des résultats de l'analyse automatique faite par le logiciel dédié) pour l'obtention des résultats définitifs dans le cadre de ce travail. La fréquence allélique (FA) de la mutation *XPO1* E571K a été estimée pour chaque échantillon par le calcul suivant : FA = n(FAM) / n (FAM+VIC), « n » étant le nombre de puits positifs. Le ratio de réactions positives par rapport aux réactions négatives est appliqué à la loi de Poisson (loi des petits nombres) ce qui a également permis une estimation précise du nombre de molécules d'ADN dans l'échantillon de départ. Nous avons obtenu ainsi une quantification exacte du variant *XPO1* E571K dans l'échantillon sans devoir recourir à une courbe standard.

Afin de consolider les résultats obtenus par cette plateforme de PCR digitale, nous avons également analysé l'ensemble des échantillons sur une seconde plateforme de PCR digitale en gouttelettes (« droplets »), le Qx200® droplet digital PCR system, laboratoire BIO-RAD, Hercules, CA, Etats-Unis)., en utilisant le même assay de PCRd pour XPO1, en suivant les recommandations du fournisseur. Les étapes de PCRd avec la technologie BIO-RAD étaient les suivantes : 1 cycle à 95°C pendant 10 minutes, puis 40 cycles de 55°C pendant 1 minute et 94°C pendant 30 secondes, puis un cycle à 55°C pendant 1 minute et un cycle de 98°C pendant 10 minutes. Afin d'établir la spécificité de notre « assay » de PCRd avec la plateforme BIO-RAD, la fréquence allélique de la mutation a été mesurée dans 20 échantillons d'ADNp pré-amplifiés, précédemment établis comme étant négatifs pour la mutation *XPO1* E571K par analyse sur un séquenceur haut-débit. Cela a permis d'estimer le bruit de fond associé à cette technique et ce type d'échantillon,

et le seuil de 0,1% de « bruit de fond » a été calculé comme celui permettant de discriminer les échantillons « positifs » versus « négatifs » pour la mutation *XPO1* E571K.

Séquençage sur Ion torrent personal genome machine™ (PGM)

Dans le but de valider nos résultats obtenus par la technologie de PCRd, nous avons réalisé des expériences de Séquençage de Nouvelle Génération (NGS) à l'aide de l'Ion Torrent Personal Genome Machine™ (PGM, Life technologies, Carlsbad, CA, Etats-Unis). Les librairies ont été préparées à partir de 10ng d'ADN génomique avec les amorces précédemment décrites du Lymphopanel (40,44) utilisé dans notre centre et ciblant le variant d'*XPO1* E571K. Les librairies amplifiées (Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0) ont été soumises à la PCR en émulsion avec l'Ion OneTouch™ 200 Template Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, Etats-Unis) en utilisant l'Ion OneTouch™ System (Life Technologies, Carlsbad, CA, Etats-Unis), d'après les recommandations du fournisseur. Les Ion Sphere™ Particles ont été ensuite enrichies à l'aide de l'Ion OneTouch™ Enrichment System puis chargées et séquencées sur une puce Ion 316™ v2 (Life Technologies). Après alignement des séquences obtenues sur le génome humain de référence, la présence de la mutation E571K (chr2:61719472C>T) a été établie par un test exact multinomial, comparant le nombre de reads présentant la base mutée (T) avec le nombre de reads présentant ce qui s'apparente à du bruit de fond (G et A). Pour chaque échantillon testé, un « False discovery rates » (FDR) a été calculé, et les échantillons avec un FDR inférieur strictement à 10% ont été considérés comme mutés. Les échantillons pour lesquels le FDR était supérieur à 10% et pour lesquels une profondeur minimale de séquençage de 1000x n'était pas atteinte, ont été considérés comme non-interprétables (NI).

Evaluation de la réponse au traitement et TEP-FDG

La réponse au traitement a été déterminée en suivant les critères de l'IWG rapportés par Cheson (45). Les images de TEP ont bénéficié d'une relecture par deux médecins nucléaires expérimentés et les résultats ont été rapportés à l'aide de l'échelle visuelle de Deauville 5 points (Annexe 3) et suivant les critères de réponse modifiés IHP 2007 (annexe 4). Le seuil pour définir la positivité de la TEP a été un score de Deauville supérieur ou égal à 4. La Réponse Complète (RC) en fin de traitement a été définie comme la négativité du PET avec ou sans masse résiduelle. Une maladie réfractaire (RD) a été définie comme une maladie stable (SD), en réponse partielle (PR) ou progressive (PD), caractérisée par la persistance de toute masse positive en TEP ou l'apparition de nouvelles lésions positives en TEP.

Analyse statistique

La survie globale (OS) a été calculée depuis la date de diagnostic jusqu'à la date des dernières nouvelles ou la date de décès, toutes causes confondues. La survie sans progression (PFS) a été calculée depuis la date de diagnostic jusqu'à la date de progression de la maladie, de la rechute, du traitement de rattrapage ou de décès, toutes causes confondues. Les courbes de survie ont été construites par la méthode de Kaplan-Meier et comparées par le test des log-rangs. La comparaison entre les paramètres moléculaires et cliniques a été réalisée au moyen de tests non paramétriques appropriés : test U de Mann-Whitney, coefficient de corrélation *tau* de Kendall et test exact de Fisher. L'ensemble de ces analyses a été réalisé avec le logiciel R (3.0.2), considérant $p < 0,05$ comme statistiquement significatif.

RESULTATS

Mutations d'*XPO1* dans le LHc au moment du diagnostic initial

Les principales caractéristiques des 94 patients inclus sont résumées dans le **Tableau 1**. Les patients étaient considérés comme mutés si la mutation *XPO1* E571K était détectée dans l'ADN extrait de la biopsie diagnostique. La mutation a été retrouvée à une fréquence de 24,2% par PCRd dans l'ADN génomique extrait de biopsie (**Tableau 1**). Dans cette série de 94 patients, l'âge médian est de 32 ans et 56,4% sont des hommes. Les principales caractéristiques cliniques des patients au diagnostic, incluant l'âge, le sex-ratio, le stade de la maladie et la présence ou non d'une atteinte médiastinale, étaient similaires chez les patients mutés ou non mutés (**Tableau 1**). Les caryotypes réalisés sur biopsie ganglionnaire au diagnostic sont présentés en **Annexe 5**. Ces caryotypes n'ont été réalisés que pour 82 des 94 patients inclus dans l'étude et le taux d'échec d'obtention de mitoses analysables était de 12/82 (14,6%). On notera 32 caryotypes sans anomalie évidente (39%), et 5 caryotypes présentant un isochromosome 9p, fréquemment décrit dans les LHc et les PMBL. Par ailleurs, on observe une importante proportion de caryotypes hyperdiploïdes (36/82 soit 43,9%), habituels dans les LHc. Un patient (N°10) présentait un remaniement de la région 2p16 où est situé le gène *REL*, à proximité du gène *XPO1*, ce patient n'était pas muté au niveau du gène *XPO1*.

Caractéristiques	Population totale	Patients mutés *XPO1* E571K	Patients non mutés *XPO1*	p
Nombre de patients	94	22 (24,2%)	69 (75,8%, NA=3)	
Hommes	53	14	38	0,6219
Femmes	41	8	31	
Médiane d'âge (années)	32	31	34	0,472
Ecart-type (SD) de l'âge	14,3	11	15	
ECOG - 0-1	89	22	65	0,569
ECOG - 2-4	5	0	4	
1ère ligne: 2-4 ABVD + RT	41	12	28	0,371
1ère ligne : 6-8 ABVD	23	3	19	
1ère ligne : BEACOPP (6 cycles)	27	7	19	
1ère ligne : MOPP ou MOPP ENDOXAN	3	0	3	
Atteinte médiastinale	37	12	24	0.134
Absence d'atteinte médiastinale	57	10	45	
Taille plus forte masse tumorale - Médiane (cm)	5	6	5	0.397
Taille plus forte masse tumorale – SD	3,72	3,52	3,86	
Histologie – LHc cellularité mixte	11	5	5	0.113
Histologie – LHc scléro-nodulaire	78	16	60	
Histologie – LHc à prédominance lymphocytaire	1	0	1	
Histologie – LHc inclassable	4	1	3	
Ann Arbor Stade 1-2	43	13	28	0,147
Ann Arbor Stade 3-4	51	9	41	
Hasenclever - 0-2	20	4	16	1,000
IPS Hasenclever - 3-7	24	4	19	
IPS Hasenclever – NA	50	14	34	
Nombre de décès	4	1	3	1,000
Réponse de fin de traitement - RC	69	18	48	0,748
Réponse de fin de traitement - Réfractaires	15	3	12	
Réponse de fin de traitement - NA	10	1	9	
Rechutes	26	6	20	1
TEP2 NEGATIVE	44	10	32	0,197
TEP2 POSITIVE	16	7	9	
TEP2 - NA	34	5	28	

Tableau 1 : **Caractéristiques des patients et évaluation de la réponse en fonction du statut mutationnel *XPO1*.**

La concordance entre la présence de la mutation dans la biopsie et le plasma des 50 patients de la cohorte « cytokines » était excellente (p=0,0179, test exact de Fisher, **Tableau 2**).

	Détection de la mutation *XPO1* E571K dans le plasma		
Statut mutationnel *XPO1* de la biopsie	**négative**	**positive**	**NA**
Non mutée	20	10	0
mutée	5	12	0
NA	0	3	0

Tableau 2 : **Association entre la détection de la mutation d'*XPO1* dans l'ADN extrait de la biopsie et le plasma par PCR digitale, p=0,0179 (Test exact de Fisher).**

Le séquençage ciblé par PGM, réalisé sur l'ADN génomique disponible extrait de biopsie de 48 patients de la cohorte « cytokines », a permis de confirmer la majorité des résultats obtenus en PCR digitale. En effet, la mutation a été retrouvée dans 40/42 biopsies analysables (NI=6, p<0,0001, test exact de Fisher, **Tableau 3**) et les fréquences alléliques du variant *XPO1* (VAF) étaient fortement corrélées entre les deux techniques (coefficient *tau* de Kendall = 0,751, p=0,000193, **Figure 4**).

	Statut mutationnel *XPO1* par PCR digitale	
Statut mutationnel *XPO1* par PGM	**Non muté**	**muté**
Non muté	26	1
muté	1	14

Tableau 3 : **Association entre la détection de la mutation *XPO1* E571K dans l'ADN extrait de biopsie par PCR digitale et séquençage PGM, p<0,0001 (Test exact de Fisher).**

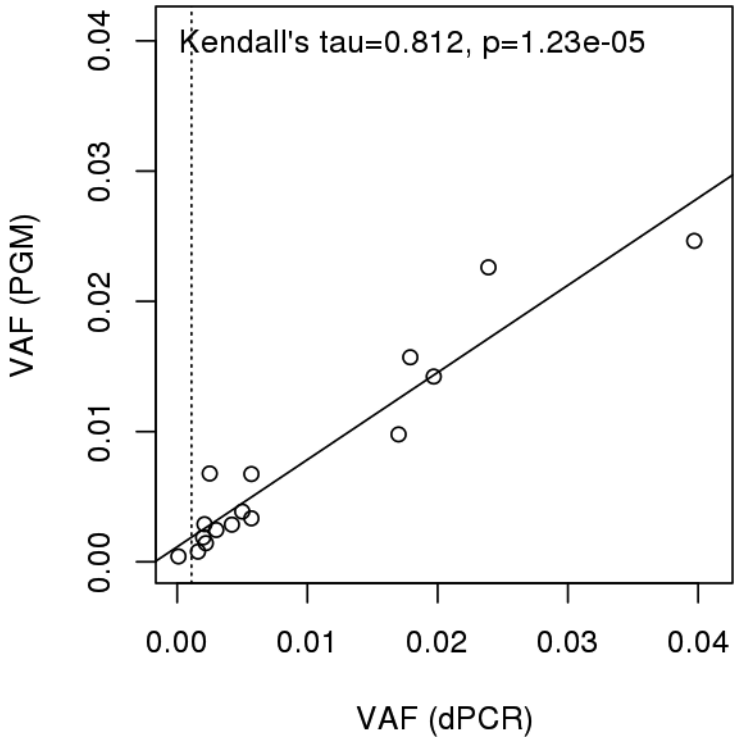


Figure 4 : Corrélation entre la VAF *XPO1* E571K obtenue par PCR digitale et séquençage PGM avec calcul du coefficient de corrélation *tau* de Kendall. La ligne pointillée verticale représente la limite de détection par PCR digitale (0.1%).

Il est intéressant de noter que la mutation n'a pas été retrouvée dans l'ADN extrait de cellules mononuclées du sang périphérique chez 4 patients mutés dans l'ADNp.

Les VAF de la mutation *XPO1* E571K étaient comprises dans un intervalle allant de 0,13% à 4,78% (médiane 0,435%) dans l'ADN extrait de biopsie. Concernant l'ADNp, les VAF étaient comprises entre 0,13% et 14,74% (médiane 0,24%). La corrélation entre les VAF dans l'ADNp et la biopsie était faible mais significative (coefficient tau de Kendall = 0,289, p=0,00931, **Figure 5**). Les résultats détaillés de PCR digitale pour les 94 patients de cette étude sont présentés en **annexe 6**.

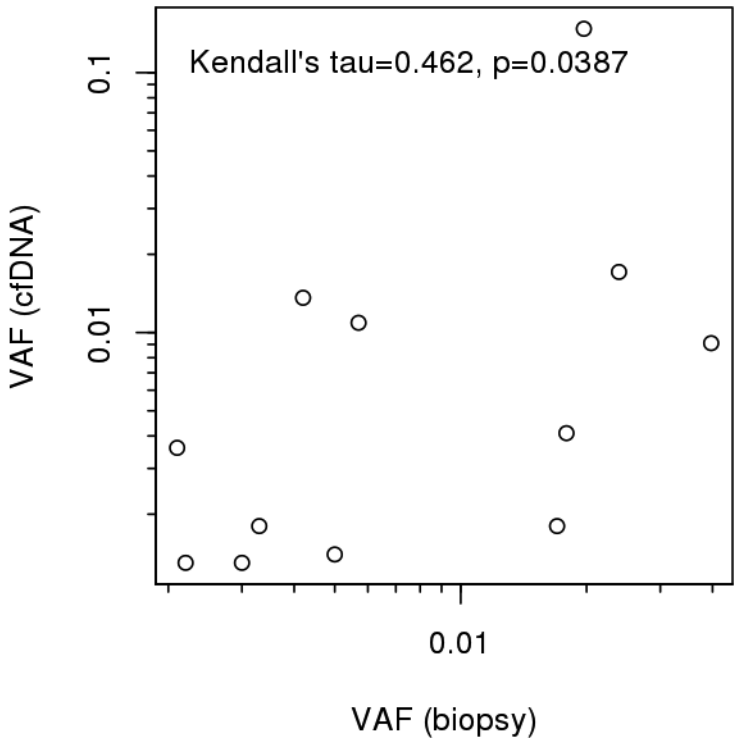


Figure 5 : Corrélation entre la VAF *XPO1* E571K obtenue par PCR digitale dans l'ADNp (cfDNA) et la biopsie avec calcul du coefficient de corrélation *tau* de Kendall.

Il existait une tendance à une concentration d'ADNp (exprimée en ng/mL de plasma extrait) plus importante chez les patients porteurs d'un LHc de stade avancé que chez les patients diagnostiqués avec un LHc de stade localisé (p=0,0894, **Figure 6**). En revanche, nous n'avons pas observé de corrélation entre la concentration d'ADNp et la fréquence allélique de la mutation *XPO1* E571K dans le plasma (p=0,735, **Figure 7**).

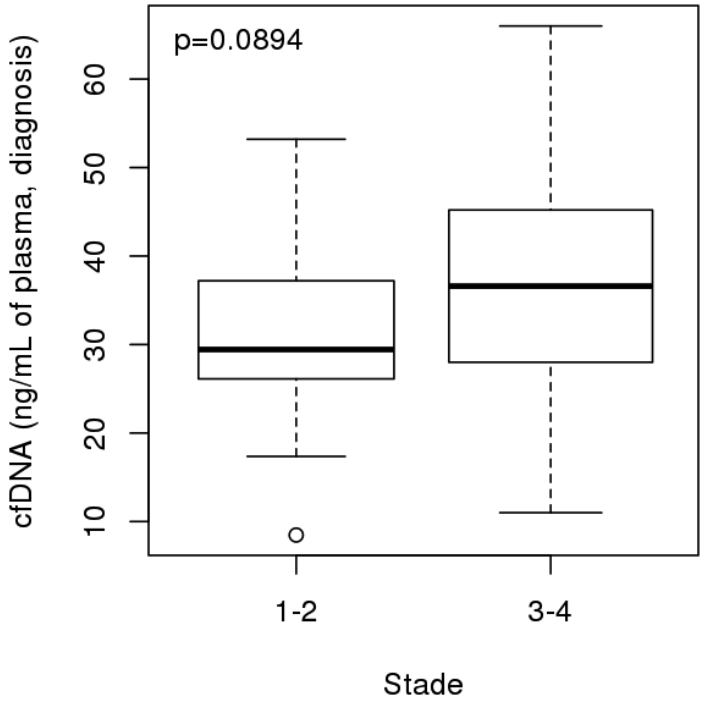


Figure 6 : Concentration d'ADNp (en ng/mL de plasma extrait) en fonction du stade de la maladie.

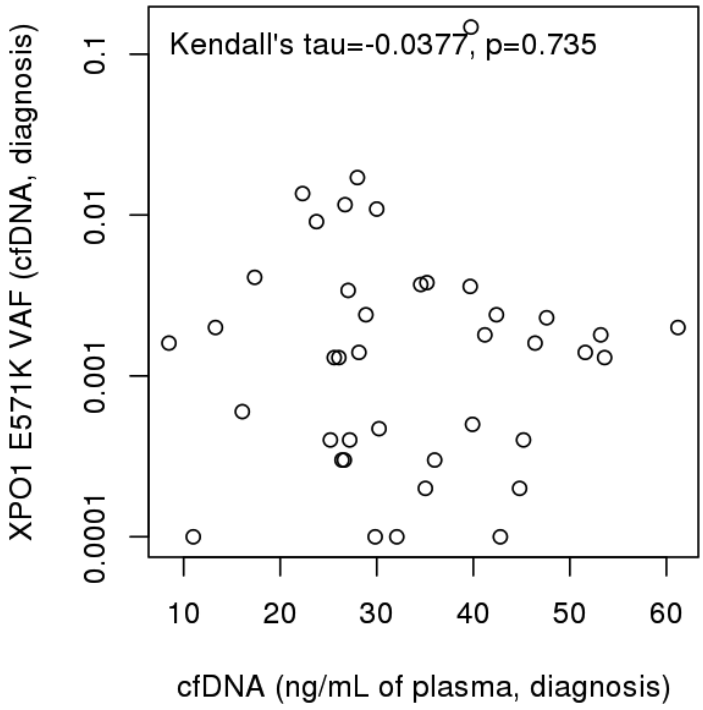


Figure 7 : Corrélation entre la VAF *XPO1* E571K obtenue par PCR digitale dans l'ADNp (cfDNA) et la concentration d'ADNp (en ng/mL de plasma) avec calcul du coefficient de corrélation *tau* de Kendall.

Les mutations d'*XPO1* étaient retrouvées en même proportion dans les sous-types scléro-nodulaires et à cellularité mixte, indiquant que la mutation n'est pas spécifique d'un sous-type de LHc en particulier. Nous n'avons pas retrouvé de mutation d'*XPO1* dans le seul cas de LHc à prédominance lymphocytaire de notre cohorte (**Tableau 1**). De plus, 5 patients présentaient une mutation d'*XPO1* uniquement dans l'ADN extrait de la biopsie. Parmi ces 5 patients, 3 étaient porteurs d'un LHc de stade localisé (stade II) avec faible masse tumorale (4 à 6cm de diamètre), tandis que les 2 autres patients avaient été diagnostiqués avec une maladie à un stade avancé (1 stade III, 1 stade IV). Enfin, 8 patients avaient une mutation d'*XPO1* détectée uniquement dans l'ADNp. Ces résultats illustrent le fait que considérer uniquement la biopsie diagnostique pour l'évaluation du statut mutationnel *XPO1* pourrait conduire à une sous-estimation de la prévalence de cette mutation, et suggèrent que l'analyse conjointe de l'ADN extrait de la biopsie et du plasma pourrait permettre d'établir avec davantage de précision le statut mutationnel *XPO1* dans le LHc.

Analyse du taux de réponse et de la survie

Suivant les critères de réponse de l'IWG, 69 patients (82,1%) obtiennent une réponse complète (RC) en fin de traitement. Le taux de RC est similaire chez les patients mutés *XPO1* et les patients non mutés (85,7% versus 80% respectivement, p=0,537). Le taux de positivité de la TEP-FDG après deux cures de chimiothérapie (TEP2) n'était pas différent chez les patients mutés versus non mutés (41,2% versus 21,95%, p=0,197).

Concernant l'analyse de la survie, le suivi médian des patients était de 34,5 mois. Les OS et PFS à 2 ans n'étaient pas différentes entre les patients mutés et non mutés, avec une probabilité d'OS et de PFS à 2 ans de 95% ($IC_{95\%}$: 85,9%-100%) et 82,2% ($IC_{95\%}$:67,8%-99,7%) respectivement chez les patients mutés *XPO1*, contre 98,1% ($IC_{95\%}$: 94,5%-100%) et

64,8% ($IC_{95\%}$: 52,9%-79,5%) chez les patients non mutés *XPO1* (p=0,637 et 0,248 pour l'OS et la PFS respectivement, **Figure 8**).

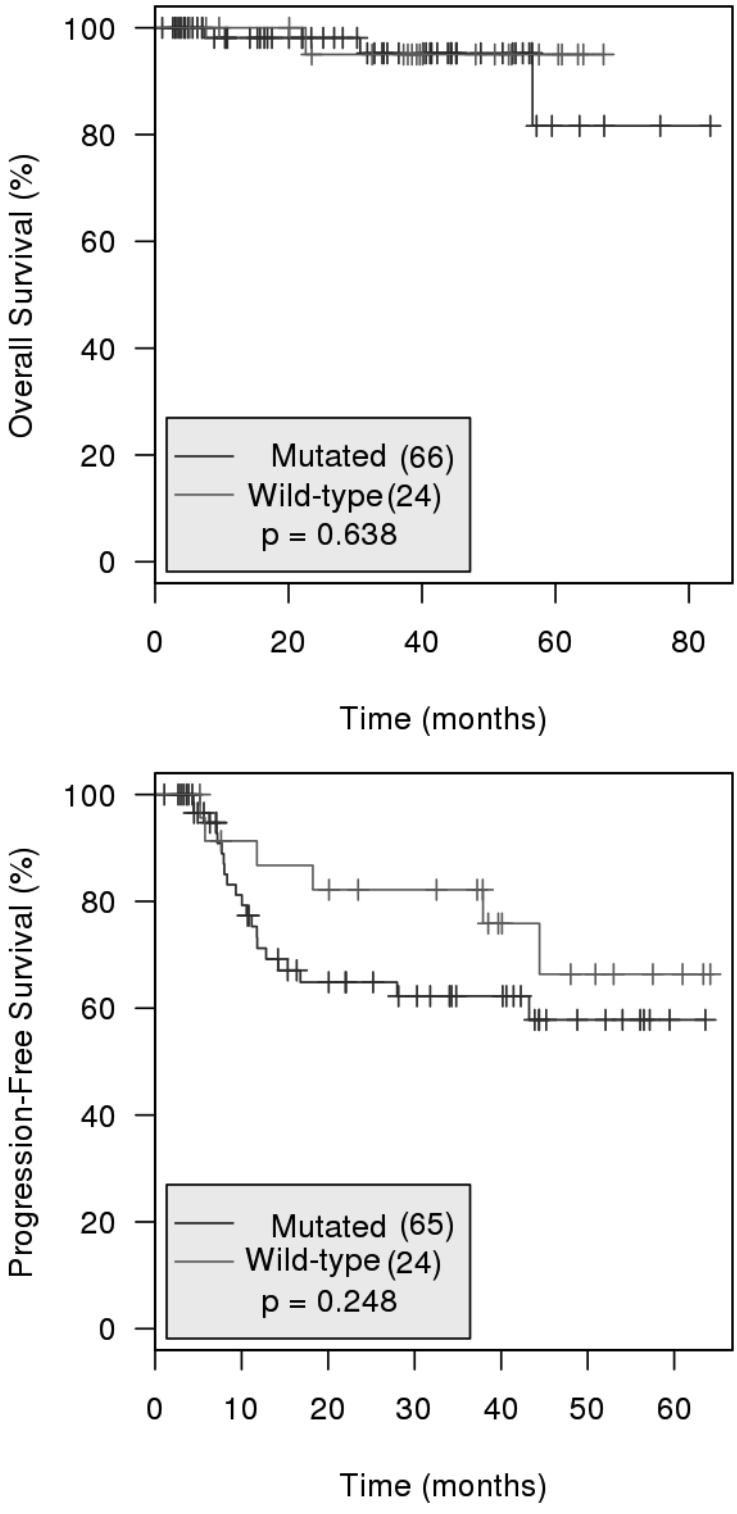


Figure 8 : Survie globale (OS) et survie sans progression (PFS) en fonction du statut mutationnel XPO1 E571K.

De plus, la positivité de la TEP2 impactait significativement la PFS à 2 ans (**Figure 9**) dans l'ensemble de la série, avec une probabilité de survie sans progression à 2 ans de 62,5% ($IC_{95\%}$: 42,8-91,4%) contre 86.1% ($IC_{95\%}$: 75,5-98,2%) pour les patients présentant une TEP2 négative (p=0,00159). Il n'existait pas d'impact pronostic de la TEP2 en terme de survie globale mais la TEP2 n'a été réalisée que chez 60/94 (63,9%) patients.

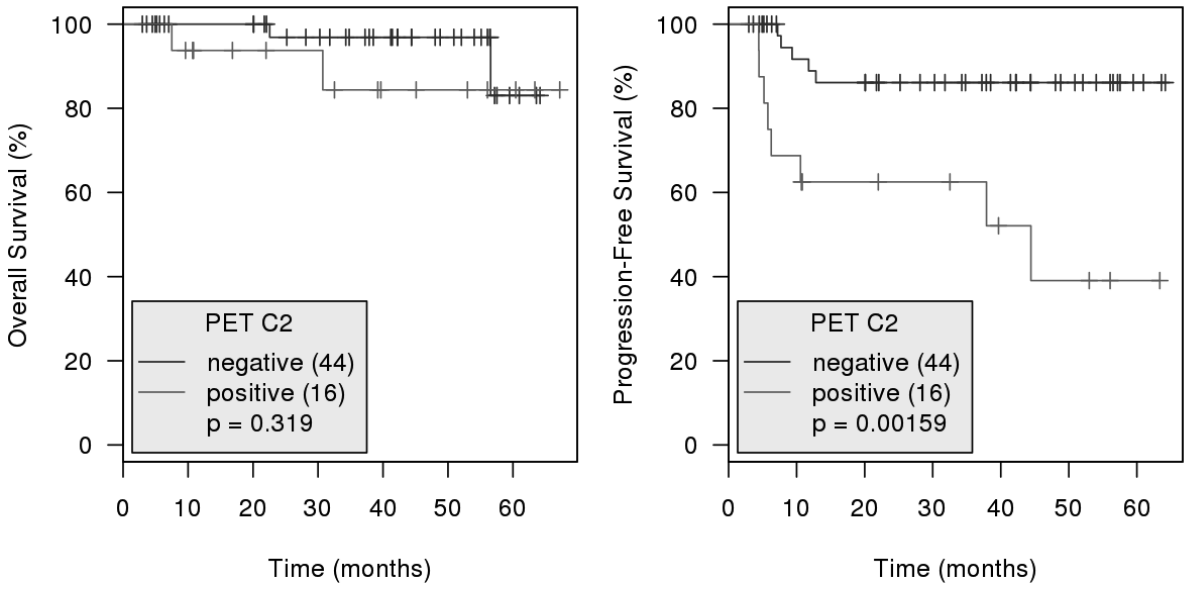


Figure 9 : Survie globale (OS) et survie sans progression (PFS) en fonction de la TEP2 dans l'ensemble de la série de patients (NA= 34).

Analyse de lignées cellulaires de Hodgkin

Nous avons analysé 6 lignées cellulaires dérivées de lymphomes de Hodgkin : KM-H2 (DSMZ : ACC 8), HDLM-2 (ACC 17), L-540 (ACC 72), L-428 (ACC 197), L-1236 (ACC 530), U-H01 (ACC 626) (46–51). La mutation *XPO1* E571K a été retrouvée dans les lignées L-1236 et Y-H01 avec des fréquences alléliques respectives de 18,5% et 85% (**Figure 10**), confirmées en séquençage par PGM.

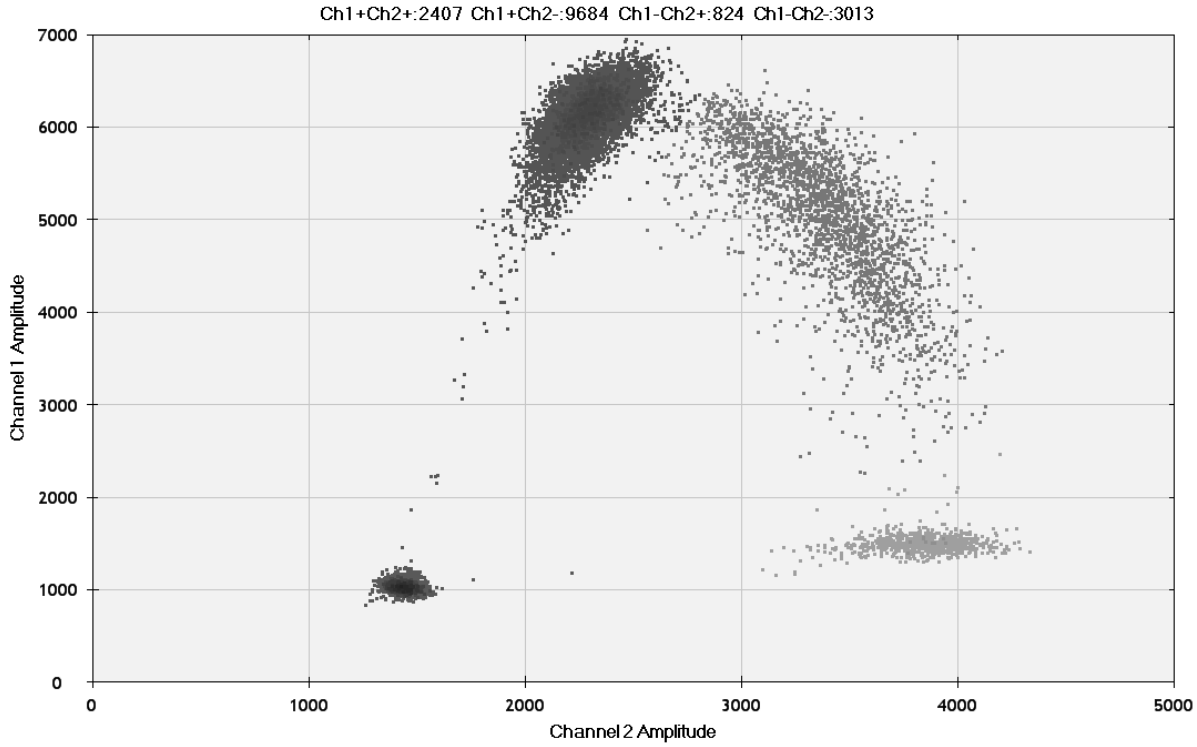


Figure 10 : Résultat de l'analyse par PCR digitale (ddPCR BIO-RAD) de la lignée U-H01 présentant la mutation *XPO1* E571K à une fréquence allélique de 85%. Chaque point représente une gouttelette générée par la technologie BIO-RAD contenant un brin d'ADN génomique, sur un total de 20.000 gouttelettes environ. Les points en gris représentent les gouttelettes dont l'ADN n'a pas été amplifié au cours de la réaction de PCR, en vert les gouttelettes contenant un brin d'ADN non muté, en bleu les gouttelettes contenant un brin d'ADN muté, en orange les gouttelettes contenant à la fois un brin d'ADN muté et un brin non muté. En abscisse figure l'intensité de fluorescence du fluorochrome VIC (sonde non mutée), en ordonnée figure l'intensité de fluorescence du fluorochrome FAM (sonde mutée).

Intérêt de l'ADN plasmatique dans le suivi de la maladie résiduelle (MRD)

L'ADNp en fin de traitement était disponible pour 28 patients de la cohorte « cytokines ». Les 66 patients restant ne disposaient pas de plasma en fin de traitement (n=46) ou n'étaient pas porteurs de la mutation dans la biopsie ou le plasma au diagnostic (n=20). La **figure 11** représente schématiquement la variation de la VAF de la mutation *XPO1* E571K dans l'ADN plasmatique des 28 patients évaluables entre le prélèvement du diagnostic et celui de la fin du

traitement (après la chimiothérapie et la radiothérapie pour les stades localisés, à l'issue des cures de chimiothérapie pour les stades avancés).

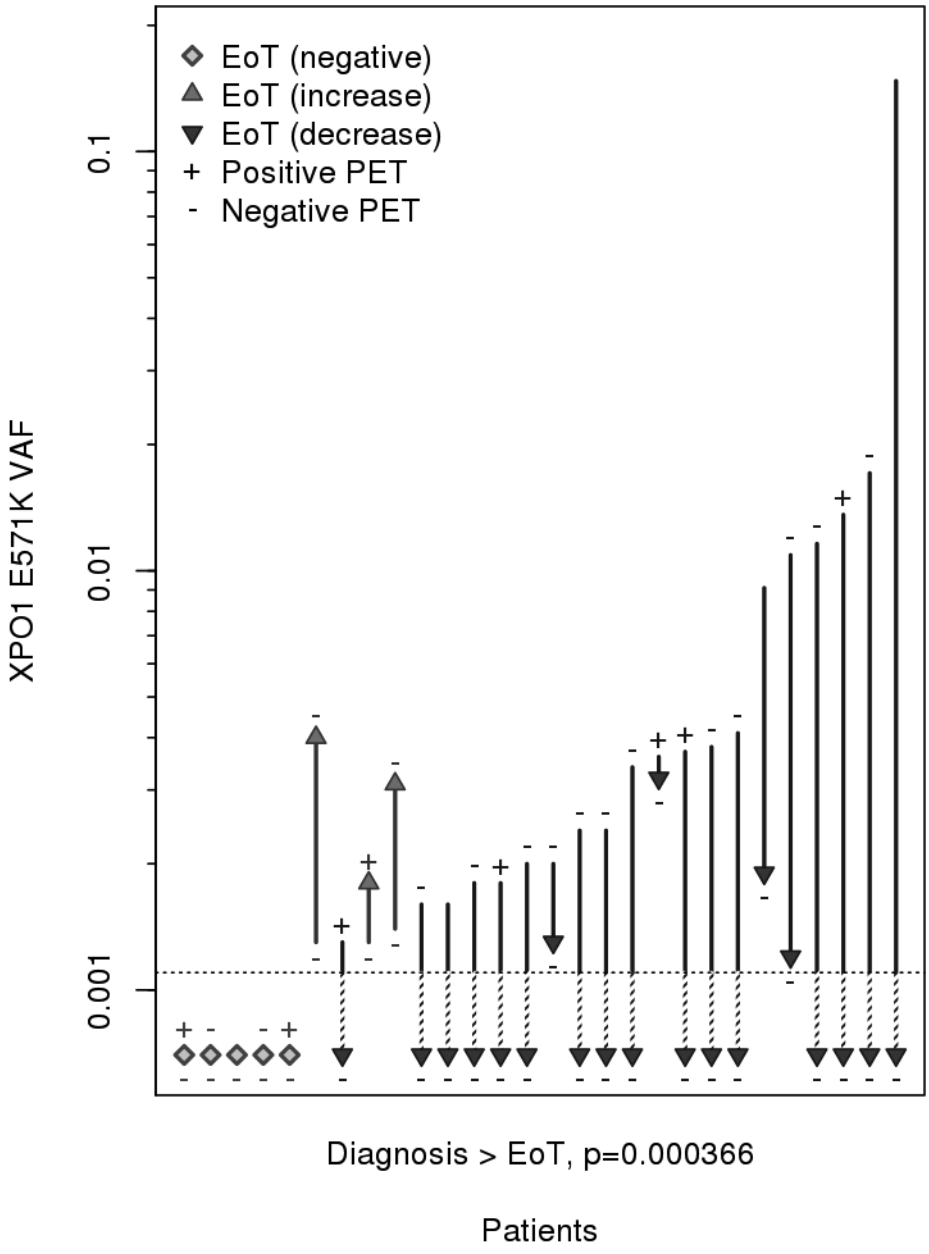


Figure 11 : Schéma représentatif de la variation de la fréquence allélique (VAF) de la mutation *XPO1* E571K dans l'ADN plasmatique des 28 patients analysables, entre le diagnostic et la fin du traitement (après 6-8 cycles de chimiothérapie pour les stades avancés, après 3-4 cycles de chimiothérapie et l'achèvement de la radiothérapie pour les stades localisés). La figure représente également le résultat de la TEP2 (à la base de la flèche, ou en haut du losange pour les patients dont la VAF était « négative » au diagnostic et en fin de traitement) et de la TEP de fin de traitement (à la pointe de la flèche, ou en dessous du losange pour les patients dont la VAF était « négative » au diagnostic et en fin de traitement). La ligne horizontale en « pointillés » représente la limite de détection de la technique (0.1%).

La majorité des patients (n=20/28) a présenté une décroissance importante de la fréquence allélique de la mutation dans le plasma entre le diagnostic et la fin du traitement, corrélée à la négativité de la TEP de fin de traitement. La mutation est devenue indétectable (au seuil de 0.1%) pour 16 patients. Par ailleurs, on note que 5 patients avaient une mutation indétectable dans le plasma (alors qu'elle était présente dans la biopsie) à la fois au diagnostic et en fin de traitement (patients avec VAF « négative », **Figure 10**). De plus, il est intéressant de noter que les patients dont la mutation restait détectable en fin de traitement avaient tendance à rechuter davantage au cours du suivi (PFS à 2 ans : 57,1% [30,1-100]) que les patients avec une mutation indétectable en fin de traitement (PFS à 2 ans : 90,5% [78,8-100%], p=0,0601, **Figure 12**). Enfin, on observe que les 3 patients dont la VAF *XPO1* E571K augmentait dans le plasma entre le diagnostic et la fin du traitement (groupe « increase », **Figure 11**) semblaient présenter un pronostic plus défavorable en OS et PFS, mais l'effectif est trop faible pour conclure avec certitude (PFS à 2 ans du groupe « increase » : 33,3% [6,7-100%] versus 90% [77,8-100%] pour le groupe « decrease », p=0,0439, données non montrées). Cependant, dans 2 cas sur 3, la TEP était négative au moment de la détection d'une augmentation de la MRD dans le plasma. Dans la cohorte globale de 94 patients, 26 (27.7%) ont présenté une rechute au cours du suivi. Parmi les 7 patients avec un plasma « positif » en fin de traitement (**Figure 12**), 4 (57%) patients ont rechuté au cours du suivi, alors que seulement un patient avait une TEP positive en fin de traitement, ce qui pourrait suggérer que notre technique serait plus sensible que la TEP en fin de traitement pour prédire la survenue d'une rechute.

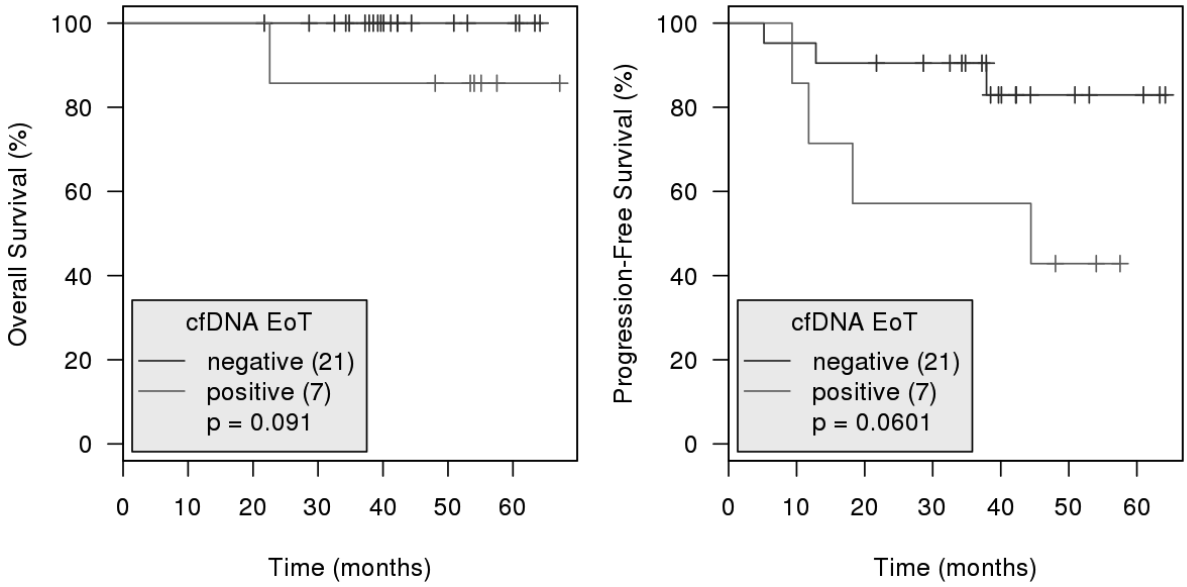


Figure 12 : Survie globale (OS) et survie sans progression (PFS) en fonction de la détection (« positive ») ou non (« negative ») de la mutation *XPO1* E571K par PCR digitale en fin de traitement dans l'ADN plasmatique (cfDNA EoT).

Nous avons pu détecter la présence de la mutation *XPO1* E571K dans la biopsie diagnostique, le plasma au diagnostic (**Figure 13**), le plasma en fin de chimiothérapie par ABVD et le plasma 3 mois après la radiothérapie pour une patiente diagnostiquée avec un LHc localisé, avec des VAF de 4,04%, 0,91%, 0,19% et 0,12% respectivement. A la rechute de la maladie, 10 mois après la fin du traitement de 1ère ligne, la mutation a de nouveau été détectée dans la biopsie de rechute (VAF 2%, **Figure 14**). Nous n'avons pas pu extraire l'ADN plasmatique pour cette patiente au moment de la rechute.

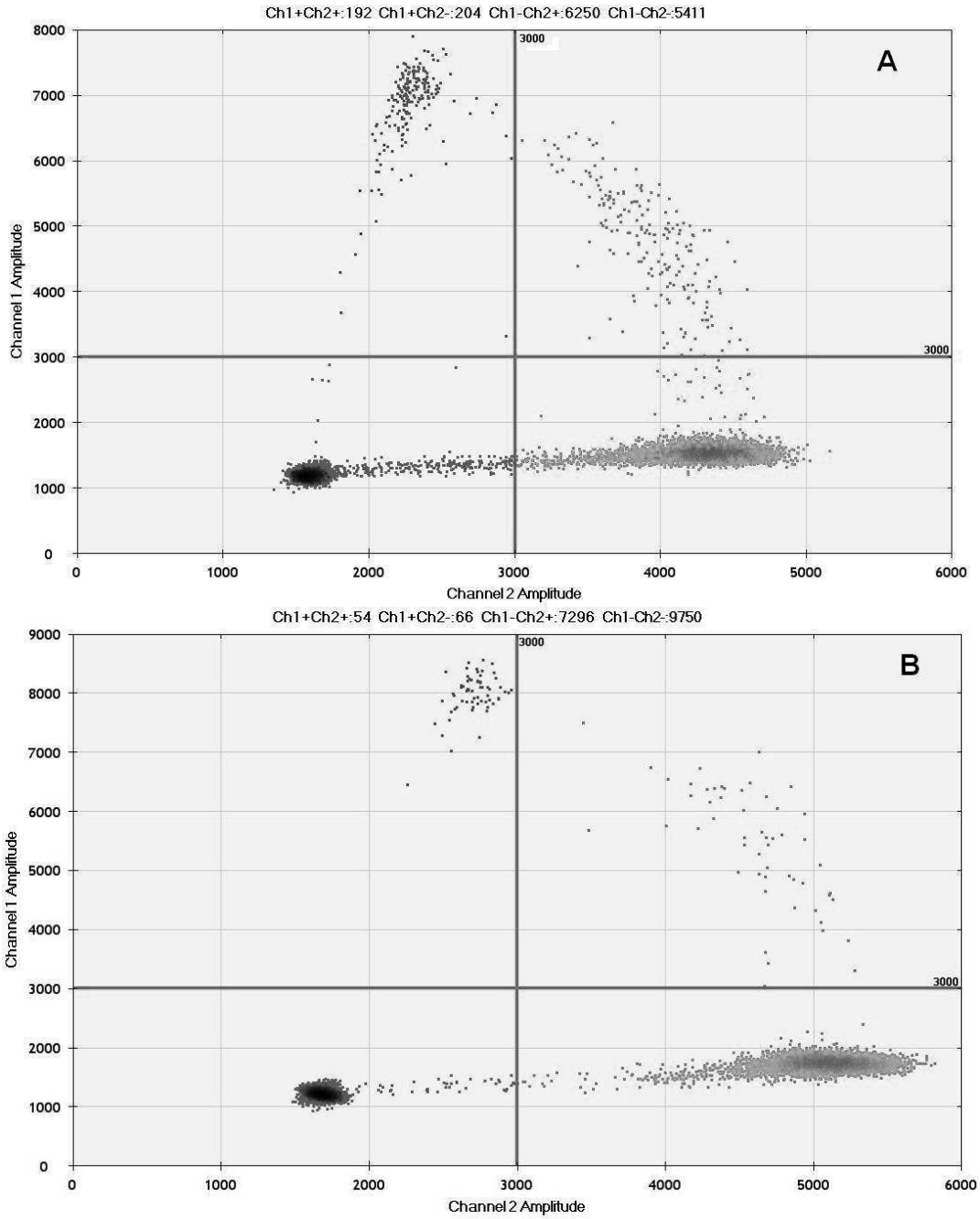


Figure 13 : Résultats de PCR digitale pour la quantification de la mutation *XPO1* E571K dans la tumeur (fréquence allélique = 3.97%, A) et le plasma (fréquence allélique = 0.91%, B) pour une patiente (N°42) diagnostiquée avec un LHc localisé.

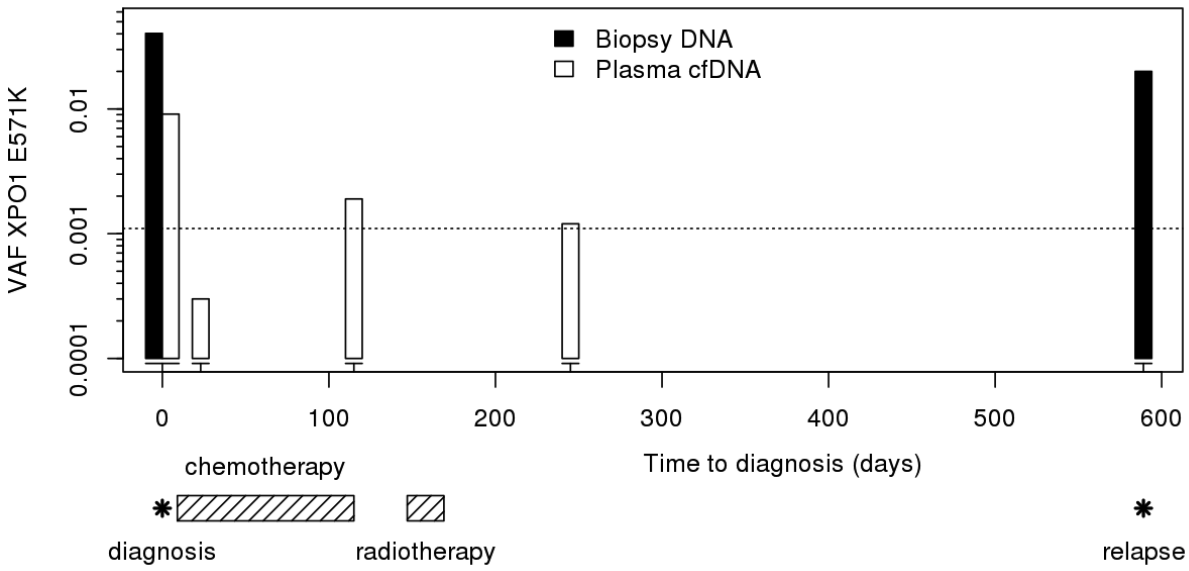


Figure 14 : Suivi de la VAF *XPO1* E571K par PCR digitale pour une patiente présentant un LHc réfractaire (Patiente N°42). La ligne pointillée représente la limite de détection (0.1%).

DISCUSSION

Notre étude rapporte pour la première fois la présence de la mutation somatique récurrente *XPO1* E571K, identifiée par PCR digitale et séquençage NGS dans une large cohorte d'échantillons de LHc non microdisséqués. Au total, 24,2% des patients inclus présentent la mutation *XPO1* E571K.

Il existe un continuum physiopathologique entre les PMBL et les LHc du sous-type scléro-nodulaire, et le fait que ces deux pathologies pourraient dériver de cellules thymiques B est actuellement un domaine de recherche et de discussion (53). Le fait que la mutation *XPO1* E571K soit retrouvée de manière fréquente et avec une prévalence similaire dans ces deux sous-types renforce l'hypothèse d'une origine ontogénique commune et d'un potentiel rôle oncogénique de ce gène. Des mutations de type substitutions d'un seul nucléotide (SNV) affectant le gène *XPO1* ont précédemment été décrites à de faibles fréquences dans la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) ainsi que dans le carcinome épidermoïde de l'œsophage, suggérant que ces mutations pourraient avoir un rôle important dans différents processus oncogéniques (33,34,54). Il convient de noter que différents variants d'*XPO1*, incluant ceux localisés au niveau du *hotspot* de l'exon 15 (24,55–57), n'étaient pas détectables par notre technique de PCRd et nous ne pouvons donc pas écarter l'hypothèse que notre étude a partiellement sous-estimé la prévalence des mutations d'*XPO1* dans le LHc. Cependant, le séquençage NGS de 48 biopsies que nous avons réalisé n'a pas permis de retrouver d'autres variant d'*XPO1* dans le LHc. A ce jour, le rôle du gène *XPO1* et l'impact de cette mutation hautement récurrente E571K dans la pathogénèse du LHc restent totalement inconnus. De nombreuses protéines, décrites pour leur rôle oncogénique dans le LHc telles que STAT1/STAT6, FOXO1 et CIITA, ont également été identifiées comme protéines cargo (58–

60) associées à XPO1. Il reste à déterminer si les mutations d'*XPO1* peuvent interférer avec la fonction de la navette régulant la localisation nucléaire/cytoplasmique de ces protéines.

L'analyse génétique des LHc a longtemps été considérablement limitée par la rareté des cellules tumorales HRS, entourées par un important infiltrat de cellules inflammatoires non malignes incluant des macrophages, lymphomes réactionnels, plasmocytes et fibroblastes (61). Ces cellules réactionnelles infiltrantes, en particulier les lymphocytes T, peuvent représenter jusqu'à 99% des cellules constituant la masse tumorale (18), ce qui explique les fréquences alléliques très faibles de la mutation *XPO1* E571K dans notre série de LHc, avec une probable dilution de l'ADN tumoral dans l'ADN non tumoral provenant des cellules réactionnelles. Nous ne pouvons affirmer avec certitude que la mutation est effectivement présente dans les cellules tumorales et non dans les cellules réactionnelles inflammatoires, ou bien que cette mutation est sous-clonale dans les cellules tumorales, mais le fait que la mutation soit retrouvée dans deux lignées de Hodgkin, et absente dans les cellules mononuclées du sang périphérique, est en faveur de la présence de cette mutation dans les cellules tumorales. Il est intéressant de noter que la mutation *XPO1* E571K avait déjà été retrouvée dans la lignée L-1236 par une technique de Whole-exome sequencing (52).

Nous pouvons en outre souligner le fait que très peu de mutations somatiques ont été décrites dans le LHc. Quelques études ont rapporté la présence de mutations du gène *TP53* dans les cellules HRS (62,63), mais à une fréquence peu élevée probablement liée à de nombreux faux négatifs. Maggio et al. ont cependant décrit des mutations de *TP53* avec une fréquence de 11.5% dans leur série de LHc et ont émis l'hypothèse que ces mutations joueraient un rôle dans la résistance des cellules HRS à l'apoptose (64). Dans cette pathologie particulière que constitue le LHc, des techniques d'analyse moléculaire de haute sensibilité comme la PCR digitale et le NGS ciblé sont essentielles pour mettre en lumière des mutations de faible fréquence allélique. Les techniques de séquençage haut débit, comme le whole genome

sequencing de faible couverture (« low coverage WGS ») (65), le séquençage ciblé d'ADN plasmatique circulant (41) ou le séquençage ciblé d'exome de cellules HRS triées (21) ont récemment permis d'identifier de nouvelles anomalies moléculaires présentes dans le LHc mais avec des effectifs d'échantillons souvent insuffisants. Toutefois, le séquençage d'exome de cellules HRS isolées a permis récemment d'identifier de nouvelle mutations ponctuelles dans le LHc, incluant des mutations déjà rapportées dans les PMBL, telles que celles affectant les gènes *CIITA*, *SOCS1*, *STAT6* et *B2M* (21,66,67). Une étude a par ailleurs rapporté un cas de mutation *XPO1* E571K mais était limitée à 10 patients seulement (21), avec une médiane de profondeur de séquençage insuffisance (48X), pouvant potentiellement limiter la découverte de nouvelles altérations génomiques dans le LHc. Le **tableau 4** résume les différentes mutations somatiques décrites à ce jour dans le LHc ainsi que les voies de signalisation concernées. Certaines mutations rapportées dans le LHc sont également retrouvées dans différents lymphomes non-hodgkiniens (LNH) de type B et de sous-type GC et dans les PMBL. Cependant, la majorité des gènes mutés dans les LHc sont spécifiques des cas de LHc (52) ce qui indique que les altérations génomiques se produisant au cours de la transformation maligne dans le LHc sont globalement distinctes de celles se produisant dans les autres LNH B de sous-type GC.

Gène	Type d'altération génomique	Voie de signalisation	Fréquence de l'anomalie (%)	Impact thérapeutique potentiel	Références
TNFAIP3	Mutations ponctuelles, délétions	NF-κB	40	Diminution de la sensibilité aux inhibiteurs de BTK et de P3K	(68)
NFKBIA	Mutations ponctuelles, délétions	NF-κB	20		(69)
NFKBIE	Mutations ponctuelles, délétions	NF-κB	15		(70)
SOCS1	Mutations ponctuelles, délétions	JAK-STAT	45	Inhibiteurs de JAK/STAT	(71)
PTPN1	mutations ponctuelles	JAK-STAT	20	Inhibiteurs de JAK/STAT	(35)
TP53	Mutations ponctuelles, délétions	p53	10		(64)
XPO1	Mutations ponctuelles	Export nucléaire	24	Selinexor, inhibiteurs spécifiques d'export nucléaire (SINE)	Camus et al, soumis
CD95	mutations ponctuelles	apoptose médiée par FAS	10		(72)
B2M	mutations ponctuelles	Présentation antigénique	70	Nivolumab, Anti PD-1	(21)

Tableau 4 : Mutations somatiques les plus fréquentes dans le LHc.

Une récente étude de NGS sur l'ADN plasmatique circulant de neuf cas de LHc scléro-nodulaires a mis en évidence les déséquilibres génomiques qui peuvent être identifiés au diagnostic et pour lesquels le suivi de l'ADN plasmatique circulant révèle une normalisation rapide des profils au cours du traitement, suggérant un rôle potentiel pour l'analyse des profils génomiques de l'ADN plasmatique en tant que marqueur de la réponse précoce au traitement (41). Bien que le LHc soit une pathologie curable, même dans les stades avancés, 20% des patients ne seront pas guéris ou n'atteindront pas la rémission complète avec la première ligne de traitement (15), et environ 25% des patients atteints de LHc rechuteront au cours du suivi,

ce qui renforce la nécessité d'identifier un biomarqueur spécifique et aisément mesurable dans cette pathologie. Dans la présente étude, nous avons réalisé une étude hautement sensible d'une large cohorte de 94 patients et identifié la mutation récurrente *XPO1* E571K pouvant servir de nouveau biomarqueur dans environ un quart des cas de LHc. De plus, nous avons mis en évidence une tendance à un impact défavorable sur la PFS de la persistance de la mutation *XPO1* E571K dans le plasma des patients en fin de traitement de 1ère ligne. De plus, notre étude a révélé un probable impact pronostique défavorable sur l'OS et la PFS de l'augmentation quantitative de la fréquence allélique de cette mutation dans le plasma en fin de traitement, ce qui suggère que la négativation de la mutation *XPO1* E571K dans le plasma en fin de traitement pourrait servir de nouveau marqueur prédictif pronostique chez les patients *XPO1* mutés. Une étude prospective dédiée sur une large cohorte de LHc est toutefois nécessaire pour confirmer ces résultats. Nos données sont concordantes avec les études précédemment publiées, notamment celle qui a permis d'établir que les niveaux de charge virale ADN de l'Epstein Barr Virus (ADN-EBV) pré-thérapeutiques, quantifiés par PCR quantitative en temps réel (RT-QPCR), étaient associés à un impact pronostique défavorable dans une large cohorte de patients porteurs d'un LHc de stade avancé non précédemment traités (73). Un autre biomarqueur potentiel intéressant est la combinaison des taux de CD163 sériques et de protéines TARC tumeur-spécifiques qui est prédictive de la réponse au traitement dans une série de 47 patients atteints de LHc (74). Ces résultats devront toutefois également être validés dans une série plus importante et la place du monitoring de la maladie résiduelle par le suivi de la mutation *XPO1* E571K dans le plasma, par rapport aux autres biomarqueurs, reste encore à établir.

Nos données sont limitées par la nature rétrospective de l'étude avec de possibles biais de sélection des patients, ainsi que par le faible nombre de plasmas analysés au diagnostic. Ces échantillons n'étaient en effet disponibles que pour la moitié des patients de notre étude, ce

qui a pu contribuer à sous-estimer la prévalence de la mutation *XPO1* E571K chez les patients pour lesquels seul un échantillon biopsique était analysable. Les quelques cas de discordance entre la détection de la mutation dans le plasma et la tumeur des patients de notre étude peuvent être expliqués notamment par la rareté des cellules tumorales sur certaines biopsies pauvres en matériel histologique, pouvant rendre la mutation indétectable dans l'ADN extrait de ces biopsies, mais également par le caractère possiblement sous-clonal de la mutation *XPO1* E571K. D'autre part, la très courte demi-vie de l'ADN plasmatique circulant (10-15 minutes) (75) ainsi que le décalage entre la date du prélèvement sanguin et la date de la biopsie, ont pu expliquer que nous ne détections pas dans certains cas la mutation dans le plasma alors qu'elle était présente dans la biopsie diagnostique. De plus, il a précédemment été rapporté que la concentration d'ADN plasmatique circulant n'était pas uniformément corrélée avec le stade de la maladie dans les cas de tumeurs solides, et que les mécanismes biologiques de libération de cet ADN tumoral dans la circulation sont encore partiellement incompris (76–78). Les résultats présentés dans notre étude sont limités aux patients diagnostiqués avec un LHc confirmé histologiquement et ne sont pas généralisables aux cas de LH associé au VIH, aux paragranulomes de Poppema et Lennert ou aux LH post-transplantation d'organe.

Enfin, les inhibiteurs pharmacologiques sélectifs d'export nucléaire (SINE) ont été décrits comme inhibant spécifiquement la protéine XPO1 en se liant à un résidu cystéine dans le domaine « cargo-binding » ce qui entraine une rétention nucléaire des protéines et facteurs de transcription suppresseurs de tumeurs (37). Compte tenu de la fréquence de la mutation *XPO1* E571K dans le LHc, suggérant un rôle crucial d'*XPO1* dans la physiopathologie de cette maladie, des investigations sont actuellement en cours pour déterminer l'impact de cette mutation sur la réponse aux inhibiteurs de type SINE (79).

CONCLUSION

Nous avons rapporté pour la première fois la présence de la mutation somatique *XPO1* E571K dans la tumeur et l'ADN plasmatique d'environ un quart des patients atteints de LHc. La détection et la quantification de cette mutation dans l'ADN plasmatique circulant pourraient constituer un nouveau biomarqueur dans cette pathologie. Nos données doivent faire l'objet d'une confirmation dans une large étude prospective dédiée et il reste à établir si la détection de cette mutation dans le plasma des patients apporte une valeur ajoutée significative par rapport à l'utilisation de la TEP-FDG dans l'évaluation de la réponse au traitement et le suivi des patients. Des travaux complémentaires sont également nécessaires pour déterminer l'intérêt d'utiliser les inhibiteurs pharmacologiques de type SINE dans le LHc.

L'article original né de cette étude et actuellement en révision dans la revue *Haematologica* est présenté en **annexe 8**.

ANNEXES

Annexe 1 – Stades de Ann Arbor

Classification de Ann Arbor modifiée selon Cotswolds (7)

Stade I: Atteinte d'un seul groupe ganglionnaire ou d'une seule structure lymphoïde

Stade II : Atteinte de deux ou plusieurs groupes ganglionnaires d'un seul côté du diaphragme. Le nombre de territoires ganglionnaires est indiqué en indice

Stade III : Atteinte ganglionnaire des deux côtés du diaphragme

Stade IV : Atteinte extra ganglionnaire distincte d'une localisation viscérale contiguë, ou atteinte du foie ou de la moelle osseuse

A : Absence de signes généraux

B : Présence de plusieurs signes généraux

- fièvre supérieure à 38°C pendant plus d'une semaine sans infection documentée
- amaigrissement de plus de 10% du poids du corps au cours des six derniers mois
- sueurs nocturnes obligeant le patient à se changer

X : masse tumorale volumineuse

E : Atteinte par contigüité

Annexe 2 – Index pronostiques dans le lymphome de Hodgkin classique

1) **Facteurs pronostiques défavorables de l'EORTC pour les stades I-II sus-diaphragmatiques** (80)

Age ≥ 50 ans
Aires ganglionnaires envahies > 3
Symptômes B et VS ≥ 30 mm 1ère heure ou absence de symptômes et VS ≥ 50 mm
Masse ganglionnaire volumineuse (≥ 10 cm ou rapport médiastino-thoracique ≥ 0.35)

->Groupe Thérapeutique Favorable : Aucun facteur défavorable

-> Groupe Thérapeutique Défavorable : Au moins un facteur

2) **Index Pronostique International pour les lymphomes hodgkiniens de stades III – IV** (6)

   L'index pronostique international est défini par le nombre de facteurs pronostiques défavorables suivants :

Age ≥ 45 ans

Sexe masculin

Stade IV

Albuminémie < 40 g/L

Hémoglobine < 10,5 g/L

Leucocytes > 15 x 10^9 / L

Lymphopénie < 0.6 x 10^9 / L ou < 8%

Annexe 3 - Echelle de Deauville 5 points

Score de Deauville pour l'interprétation de la TEP-FDG (10)

Score	Résultat TEP-FDG	Catégorie
1 : Absence de fixation supérieure au bruit de fond	TEP-FDG négative	**1** réponse métabolique complète
2 : Fixation < au médiastin	TEP-FDG négative	**1** réponse métabolique complète
3 : Fixation > médiastin mais < foie. Si la fixation du compartiment sanguin du médiastin est >= à celle du foie, l'activité de la lésion doit être comparée à la fixation hépatique. Fixation de la lésion < fixation hépatique = score 2 Fixation de la lésion >= fixation hépatique = score 3	TEP-FDG négative	**1** réponse métabolique complète
4 : Fixation modérée comparée à la fixation du foie	TEP-FDG positive	**2** réponse métabolique partielle
5 : Augmentation prononcée de la fixation comparée à la fixation du foie	TEP-FDG positive	**3** absence de réduction significative de l'absorption ou apparition de nouvelles lésions.

Score 1, 2 ou 3 = TEP-FDG négative
Score 4, 5 fixation supérieure à la fixation du foie = TEP-FDG positive

Annexe 4 : Critères de réponse modifiés IHP 2007 (45)

Response Definitions for Clinical Trials

Response	Definition	Nodal Masses	Spleen, Liver	Bone Marrow
CR	Disappearance of all evidence of disease	(a) FDG-avid or PET positive prior to therapy; mass of any size permitted if PET negative (b) Variably FDG-avid or PET negative; regression to normal size on CT	Not palpable, nodules disappeared	Infiltrate cleared on repeat biopsy; if indeterminate by morphology, immunohistochemistry should be negative
PR	Regression of measuable disease and no new sites	≥ 50% decrease in SPD of up to 6 largest dominant masses; no increase in size of other nodes (a) FDG-avid or PET positive prior to therapy; one or more PET positive at previously involved site (b) Variably FDG-avid or PET negative; regression on CT	≥ 50% decrease in SPD of nodules (for single nodule in greatest transverse diameter); no increase in size of liver or spleen	Irrelevant if positive prior to therapy; cell type should be specified
SD	Failure to attain CR/PR or PD	(a) FDG-avid or PET positive prior to therapy; PET positive at prior sites of disease and no new sites on CT or PET (b) Variably FDG-avid or PET negative; no change in size of previous lesions on CT		
Relapsed disease or PD	Any new lesion or increase by ≥ 50% of previously involved sites from nadir	Appearance of a new lesion(s) > 1.5 cm in any axis, ≥ 50% increase in SPD of more than one node, or ≥ 50% increase in longest diameter of a previously identifed node > 1 cm in short axis Lesions PET positive if FDG-avid lymphoma or PET positive prior to therapy	> 50% increase from nadir in the SPD of any previous lesions	New or recurrent involvement

Abbreviations: CR, complete remission; FDG, [^{18}F]fluorodeoxyglucose; PET, positron emission tomography; CT, computed tomography; PR, partial remission; SPD, sum of the product of the diameters; SD, stable disease; PD, progressive disease.

Annexe 5 – Caryotype des 94 patients inclus dans l'étude

Patient	Caryotype conventionnel en bandes R sur biopsie ganglionnaire diagnostique
1	NON FAIT
2	96, XX, clonal [3]
3	NON FAIT
4	NON FAIT
5	46, XY [22]
6	78, XY [1] / 46, XY [15]
7	échec
8	46, XX [20]
9	échec
10	78-82XXX,+i(1)(q10),add(2)(p16),+5, del(6)(q16q22),+i(9)(p11),+10,+12,-13,del?(14)(q22q24),add(18)(q23),+21,+mx3 [cp7] / 46,XX[3]
11	46, XY [20]
12	NON FAIT
13	46, XY [20]
14	46, XX [12]
15	46, XY [20]
16	93,XX,-Y,,-1,-4,+5,+5,+5,-9,+mar [1] / 46,XY [13]
17	89-93XXYY,-2,-8,-11,-13,-15,+16,+mx6 [cp3] / 46,XY [10]
18	NON FAIT
19	NON FAIT
20	échec
21	74-76,XX,+1,+1,del(1)(p35),+2,+2,add(2)(p11),+3,+3,,+4,add(4)(q35),+5,+5,+6,add(6)(q15),+7,+7,+8,+9,add(9)(q34),+11,+12,add(12)(q24),+17,+17,+18,+19,+19,+mx10 [cp4] / 46,XX [5]
22	46,XX [21]
23	NON FAIT
24	67-71,XXY,+1,add(1)(p33),del(1)(q31),+2,+3,+add(3)(p11),add(3)(q22),add(4)(q31),+6,del(6)(q12q24),+7,add(7)(p15),+8,i(8)(q11),+9,+9,i(9)(p11)x2,+10,+add(10)(q25),+11,+12,+16,+18,+18,+19,+20,+21,+mx10 [cp6] / 46,XY [2]
25	46, XY [20]
26	45-50,XY,i(2)(p10),add(11)(q21),-20, +m,+r [cp7] / 46,XY [13]
27	46,XX [20]
28	46,XX [6]
29	échec

30	9-61,XY,+1,add(1)(q44),del(1)(p21p32), add(2)(p11),+3,+4,add(4)(q35),-5,del(6)(q13q25),+10,+11,del(11)(p12), add(11)(p15),+12,add(12)(q24),add(13)(p11),+add(13)(p11)x2,-14, +16,add(17)(q25),+19,-20,-21,-22,+mx8 [cp2] / 46,XY [7]
31	46,XX [20]
32	67<3n>,add(X)(p22),-X,-1,del(6)(q21q25),-10,-11,-13,-17,-18,+19,+20,+mx4 [2] / 46,XX [3]
33	75,XXX,anormal, clonal, non analysable[2]/46,XX[4]
34	échec
35	46,XY [18]
36	57,XX,+X,+X,del(4)(q23q26),+5,del(8)(p22),+9,add(14)(p11),+19,+20,+21,+m,+m,+m [cp5] / 46,XX [7]
37	46,XX [20]
38	échec
39	46,XY [20]
40	46,XX [20]
41	72-81,XXYY,+1,+2,del(2)(p24),+3,+3,+4,add(4)(q31),+5,del(6)(q22q25),+8,+9,+9,+14,+14,add(14)(q32),+17,+17,+18,+18,+19x2,+20x2,+21[cp5] / 46,XY [8]
42	échec
43	70-72XX,+1,+2,-6,-7,+9,add(9)(p24),+10,-11, -13,-16,-21,+mx8 [cp3] / 46,XX [1]
44	NON FAIT
45	NON FAIT
46	échec
47	échec
48	46,XY [20]
49	46,XY [20]
50	NON FAIT
51	46,XY [20]
52	46,XY [20]
53	46,XY [20]
54	NON FAIT
55	échec
56	NON FAIT
57	48,XX,+5,del(7)(q31),add(9)(q34),add(14)(p12)(q32),add(15)(p12),+mar [11] /46,XX [4]
58	56-70,XX [2] / 46,XX [2]
59	46,XX [23]
60	46,XY [20]
61	46,XY [20]
62	46,XY [22]
63	67-96<4n>,XY,-2,add(4)(p16),-6,add(6)(p25),-8,+9,add(9)(q31),-10,add(12)(q24)x2,-13,add(13)(p11),+14,add(16)(q23)x2,del(17)(p12),-18,-20x2,-22,+m1-5 [cp5) / 46,XY [10]
64	46,XY [20]

65	60, anormal, clonal, non analysable
66	échec
67	échec
68	67-76,XXYY,+1,+2,+3,+4,+5,+6,+7,+8,+9,del(9)(q31),+10,+11,+12,+14x2,+15,+16,+17,+18,+19,+21x2,+22x2,+mar5-7 [cp5] / 46,XY [16]
69	53,XY,-1,+2,+3,+6,+7,+8,+add(8)(p11),+i(9)(p10)x2,-10,+12x2,+13,- 14,+16,del(18)(q21),-20,-20,-22 [1] / 46,XY [1]
70	72-74,XX,<3n>,add(1)(p33),-4,+5,-6,-8,add(8)(p21),+9,+9,+add(11)(p12),add(11)(q23)x2,+12,-13,+14,add(14)(p12)x2,-15,+16,+18,+add(1 9)(p13),-21,+mars[cp5]/ 46,XX[2]
71	74,XX,<3n>,del(1)(q24),+2,-6,-6,-8,i(9)(p10),+i(9)(p10),-10,-13,i(13)(q10),+14,-16,-18,+19,+19,-20,-22,+6mars [1] / 46,XX [17]
72	46,XX [26]
73	46,XY [20]
74	80-85<4n>,XYadd(3)(q26),add(3)(q24),del(6)(q21),-7,-8,del(9)(q22),-14,-14,-17,-18,+mar3-4 [cp2] / 46,XY [16]
75	47-51,X,add(X)(q28),add(3)(p25),del(6)(q13q15),+m1-4 [cp10] / 46,XX [3]
76	72-75,XY,+X,+Y,+1,del(1)(p34),+2,+3,add(3)(p24),add(4)(p14),add(4)(p15)(q27),+del(4)(q27),+5,+7,del(7)(p15)(q34),+8,+9,+10,+11,+12,+14x2,i(14)(q10),+15,+16,+17,+18,+19x2,+20x2,+21,+add(22)(q13),+mars3-5 [cp5] / 46,XY [20]
77	46-48,XY,clonal, inclassable [5]
78	46,XX [24]
79	48,XY,t(1;19)(q12;p12),add(5)(p15),del(7)(q32),+add(9)(p23),t(9;9)(p13;q34),add(13)(p11),+m [6] / 46,XY [2]
80	45,X,-Y,add(1)(q21),add(7)(q25),add(7)(q22),-12,+mar1-2 [cp6] /46,XY [17]
81	91-95<4n>,XY,del(1)(p34),+dup(1)(p12p31),+2,+3,-6,-7,+9,+10x2,+12,+14,-15,+16,+17,+19x2,+marx3 [cp5] / 46,XY [3]
82	47-79<4n>XY,-1,add(2)(p11),add(3)(q12),-4,-6,-7,+9,-10,-11,+12,-13,add(13)(p11),-14,-15,-18,-19,-20,+21,i(21)(q10),-22,+mar1-2[cp7] / 46,XY [3]
83	80-84<4n>,XX,-X,add(1)(q25),-4,add(4)(q31),del(6)(q15q26),dup(7)(q11q22),-8,-11,+12,-13,-14,-15,-21,-22,+mar2-6 [cp4] / 46,XX [3]
84	46,XY [20]
85	97-102,XXXYY,<4n>,+3,i(5)(q10),-6,-6,i(6)(p10),-7,-7,add(9)(p24),add(9)(p11),+12,+i(12)(q11),-13,i(13)(q10),+19x3,+20x2,-21,+mars[cp2]/46,XY[8]
86	68,XXX,<3n>,+2,+3,-4,-7,i(8)(q10),del(9)(q23q34),+del(9)(q12)x2,del(11)(23),add(14)(p12),-15,-22,+mars[5]/ 46,XX[13]
87	76,XXY,<3n>,+1,+3,-4,-5,-5,-7,+12,-13,+15,-16,-17,+mars[5]/46,XY[5]
88	78,XX,<3n>,+2,+5,del(6)(q15q27),-8,i(9)(p10),+12,+12,+16,+19,+mars[2]/46,XX[3]
89	46,XX[22]

90	84,XX,anormal [4] / 46,XX [10]
91	46,XY [20]
92	72-73,XX,+1,+2,+3x2,+5x2,+6,+7,+8x2,+9,add(9)(q21),+11x2,+12,+16,add(17)(q25),+18x2,+19x2,+20x2,+22x2,+m3-4 [cp6] / 46,XX [10]
93	52,X,-Y,+X,+5,+6,+9,+10,+18,+m [2] / 46,XY [19]
94	46,XY [15]

Annexe 6 – Résultats détaillés de PCR digitale pour les 94 patients

Patient	Sexe	Age	Histologie	Stade	*XPO1* E571K VAF biopsie diagnostic	*XPO1* E571K VAF plasma diagnostic	Concentration d'ADNp (ng/mL de plasma) diagnostic	*XPO1* E571K VAF plasma fin de traitement	concentration d'ADNp (ng/mL de plasma) fin de traitement
1	Homme	26	LHc scléro-nodulaire	1	0.00%	1.16%	26.72	0.00%	11.76
2	Homme	25	LHc scléro-nodulaire	4	0.01%	0.00%	37.2	NA	NA
3	Homme	41	LHc scléro-nodulaire	2	1.79%	0.41%	17.36	0.10%	9.97
4	Homme	25	LHc scléro-nodulaire	4	0.01%	0.02%	44.8	NA	NA
5	Femme	34	LHc scléro-nodulaire	3	0.01%	0.00%	58.4	NA	NA
6	Homme	39	LHc scléro-nodulaire	2	0.01%	0.00%	39.36	NA	NA
7	Femme	31	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	0.01%	42.8	NA	NA
8	Homme	18	LHc scléro-nodulaire	2	0.01%	0.00%	26.8	NA	NA
9	Femme	39	LHc scléro-nodulaire	4	0.01%	0.14%	28.16	0.31%	4.69
10	Femme	22	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	0.00%	22	NA	NA
11	Femme	41	LHc scléro-nodulaire	3	0.00%	0.00%	52	NA	NA
12	Femme	41	LHc scléro-nodulaire	3	0.00%	0.03%	26.4	NA	NA
13	Homme	20	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	0.13%	25.6	0.40%	9.6
14	Femme	18	LHc scléro-nodulaire	2	NA	0.16%	8.48	0.08%	2.85
15	Homme	43	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	0.04%	27.2	NA	NA
16	Femme	21	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	0.37%	34.56	0.00%	8.69
17	Femme	25	LHc scléro-nodulaire	2	0.42%	1.36%	22.32	0.09%	9.07
18	Femme	35	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	0.01%	11	0.04%	11.04
19	Femme	23	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	0.24%	28.88	0.07%	5.73
20	Femme	57	LHc scléro-nodulaire	2	0.03%	0.03%	26.64	NA	NA
21	Femme	34	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	0.04%	25.2	NA	NA
22	Femme	18	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	0.01%	32.08	NA	NA
23	Homme	35	LHc cellularité mixte	2	1.97%	14.74%	39.76	0.08%	11.44
24	Homme	22	LHc scléro-nodulaire	3	0.00%	0.24%	42.4	0.00%	4.27
25	Homme	34	LHc scléro-nodulaire	4	0.57%	0.06%	16.08	0.10%	4.99
26	Homme	22	LHc cellularité mixte	2	0.50%	0.14%	51.6	NA	NA
27	Homme	42	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	0.04%	45.2	NA	NA
28	Homme	21	LHc scléro-nodulaire	4	2.39%	1.71%	28	0.00%	5.31

29	Femme	43	LHc scléro-nodulaire	3	0.00%	0.00%	34.08	NA	NA
30	Femme	24	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	0.03%	36	NA	NA
31	Homme	30	LHc scléro-nodulaire	2	0.02%	0.34%	27.04	0.00%	9.95
32	Homme	44	LHc scléro-nodulaire	3	0.00%	0.00%	66	0.04%	15.2
33	Homme	19	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	0.20%	13.3	0.00%	7.49
34	Femme	42	LHc cellularité mixte	4	0.00%	0.05%	39.92	0.04%	9.68
35	Homme	31	LHc scléro-nodulaire	4	0.01%	0.23%	47.6	NA	NA
36	Homme	29	LHc cellularité mixte	3	0.22%	0.13%	26.08	0.08%	8.05
37	Homme	30	LHc scléro-nodulaire	2	0.25%	0.02%	35.04	0.03%	3.92
38	Femme	21	LHc scléro-nodulaire	2	0.57%	1.09%	30	0.12%	8.21
39	Femme	62	LHc scléro-nodulaire	4	0.30%	0.13%	53.6	0.18%	18.67
40	Homme	32	LHc cellularité mixte	2	0.20%	0.00%	31.68	0.04%	11.47
41	Homme	36	LHc inclassable	3	0.00%	0.20%	61.2	0.13%	3.87
42	Femme	28	LHc scléro-nodulaire	2	3.97%	0.91%	23.76	0.19%	7.15
43	Homme	23	LHc scléro-nodulaire	3	0.16%	0.05%	30.24	0.00%	8.75
44	Homme	27	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	0.01%	29.84	NA	NA
45	Femme	32	LHc inclassable	3	1.70%	0.18%	41.2	0.02%	27.2
46	Femme	55	LHc scléro-nodulaire	2	0.33%	0.18%	53.2	0.02%	10.99
47	Homme	25	LHc inclassable	2	0.45%	0.00%	34.48	0.01%	16
48	Femme	27	LHc scléro-nodulaire	1	0.21%	0.36%	39.68	0.32%	22.2
49	Homme	38	LHc cellularité mixte	2	NA	0.16%	46.4	0.08%	13.6
50	Femme	60	LHc scléro-nodulaire	4	NA	0.38%	35.2	0.00%	8.43
51	Homme	63	LHc cellularité mixte	3	0.00%	NA	NA	NA	NA
52	Homme	46	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	NA	NA	NA	NA
53	Homme	44	LHc scléro-nodulaire	4	0.01%	NA	NA	NA	NA
54	Femme	25	LHc inclassable	4	0.01%	NA	NA	NA	NA
55	Femme	77	LHc cellularité mixte	4	0.01%	NA	NA	NA	NA
56	Femme	24	LHc scléro-nodulaire	3	0.02%	NA	NA	NA	NA
57	Femme	31	LHc scléro-nodulaire	2	0.01%	NA	NA	NA	NA
58	Femme	21	LHc scléro-nodulaire	2	0.01%	NA	NA	NA	NA
59	Femme	33	LHc riche en lymphocytes	2	0.03%	NA	NA	NA	NA
60	Homme	53	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	NA	NA	NA	NA

61	Homme	55	LHc scléro-nodulaire	1	0.01%	NA	NA	NA	NA
62	Homme	35	LHc cellularité mixte	2	0.01%	NA	NA	NA	NA
63	Homme	40	LHc scléro-nodulaire	4	0.13%	NA	NA	NA	NA
64	Homme	57	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	NA	NA	NA	NA
65	Homme	47	LHc scléro-nodulaire	4	0.01%	NA	NA	NA	NA
66	Homme	25	LHc scléro-nodulaire	4	0.18%	NA	NA	NA	NA
67	Homme	54	LHc scléro-nodulaire	4	0.02%	NA	NA	NA	NA
68	Homme	78	LHc scléro-nodulaire	4	0.01%	NA	NA	NA	NA
69	Homme	35	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	NA	NA	NA	NA
70	Femme	57	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	NA	NA	NA	NA
71	Femme	52	LHc inclassable	2	0.00%	NA	NA	NA	NA
72	Femme	20	LHc scléro-nodulaire	3	0.00%	NA	NA	NA	NA
73	Homme	38	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	NA	NA	NA	NA
74	Homme	50	LHc scléro-nodulaire	2	0.01%	NA	NA	NA	NA
75	Femme	18	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	NA	NA	NA	NA
76	Homme	21	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	NA	NA	NA	NA
77	Homme	83	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	NA	NA	NA	NA
78	Femme	33	LHc scléro-nodulaire	4	0.01%	NA	NA	NA	NA
79	Homme	51	LHc scléro-nodulaire	2	1.42%	NA	NA	NA	NA
80	Homme	25	LHc scléro-nodulaire	2	0.02%	NA	NA	NA	NA
81	Homme	32	LHc scléro-nodulaire	4	0.27%	NA	NA	NA	NA
82	Homme	21	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	NA	NA	NA	NA
83	Femme	36	LHc scléro-nodulaire	4	0.01%	NA	NA	NA	NA
84	Homme	46	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	NA	NA	NA	NA
85	Homme	26	LHc scléro-nodulaire	4	0.00%	NA	NA	NA	NA
86	Femme	32	LHc scléro-nodulaire	2	4.78%	NA	NA	NA	NA
87	Homme	22	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	NA	NA	NA	NA
88	Femme	28	LHc scléro-nodulaire	2	0.00%	NA	NA	NA	NA
89	Femme	55	LHc scléro-nodulaire	3	0.00%	NA	NA	NA	NA
90	Femme	24	LHc scléro-nodulaire	4	0.01%	NA	NA	NA	NA
91	Homme	32	LHc scléro-nodulaire	2	0.01%	NA	NA	NA	NA
92	Femme	22	LHc scléro-nodulaire	4	0.01%	NA	NA	NA	NA
93	Homme	25	LHc scléro-nodulaire	4	0.01%	NA	NA	NA	NA
94	Homme	42	LHc cellularité mixte	4	0.00%	NA	NA	NA	NA

Annexe 7 – Manuscrit publié présentant la méthode de PCR digitale

LEUKEMIA & LYMPHOMA, 2016
http://dx.doi.org/10.3109/10428194.2016.1139703

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL ARTICLE: RESEARCH

Digital PCR for quantification of recurrent and potentially actionable somatic mutations in circulating free DNA from patients with diffuse large B-cell lymphoma

Vincent Camus[a,b], Nasrin Sarafan-Vasseur[c], Elodie Bohers[b], Sydney Dubois[b], Sylvain Mareschal[b], Philippe Bertrand[b], Pierre-Julien Viailly[b], Philippe Ruminy[b], Catherine Maingonnat[b], Emilie Lemasle[a,b], Aspasia Stamatoullas[a,b], Jean-Michel Picquenot[d], Marie Cornic[d], Ludivine Beaussire[c], Christian Bastard[b,e], Thierry Frebourg[c], Hervé Tilly[a,b] and Fabrice Jardin[a,b]

[a]Department of Hematology, Centre Henri Becquerel, Rouen, France; [b]INSERM U918, Centre Henri Becquerel, University of Rouen, Rouen, France; [c]INSERM U1079, University of Rouen, Rouen, France; [d]Department of Pathology, Centre Henri Becquerel, Rouen, France; [e]Department of Genetic Oncology, Centre Henri Becquerel, Rouen, France

ABSTRACT

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is an aggressive and heterogeneous malignancy harboring frequent targetable activating somatic mutations. Emerging evidence suggests that circulating cell-free DNA (cfDNA) can be used to detect somatic variants in DLBCL using Next-Generation Sequencing (NGS) experiments. In this proof-of-concept study, we chose to develop simple and valuable digital PCR (dPCR) assays for the detection of recurrent exportin-1 (*XPO1*) E571K, *EZH2* Y641N, and *MYD88* L265P mutations in DLBCL patients, thereby identifying patients most likely to potentially benefit from targeted therapies. We demonstrated that our dPCR assays were sufficiently sensitive to detect rare *XPO1*, *EZH2*, and *MYD88* mutations in plasma cfDNA, with a sensitivity of 0.05%. cfDNA somatic mutation detection by dPCR seems to be a promising technique in the management of DLBCL, in addition to NGS experiments.

ARTICLE HISTORY
Received 19 October 2015
Revised 29 December 2015
Accepted 3 January 2016

KEYWORDS
Circulating DNA; digital PCR; DLBCL; exportin-1; somatic mutations

Downloaded by [Rouen University] at 02:27 17 February 2016

Introduction

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of high-grade non-Hodgkin lymphoma (NHL) among adults, accounting for up to 30–40% of newly diagnosed cases. The crude incidence in the European Union is 5–6/100 000/year.[1,2] The molecular heterogeneity of DLBCLs has been described by gene expression profiling (GEP), delineating three main molecular subtypes: Germinal Center B-cell like (GCB), Activated B-cell like (ABC), and Primary Mediastinal B-cell lymphoma (PMBL), with distinct outcomes and responses to treatment. Although DLBCL is curable even in advanced stages, up to one-third of patients will not be cured or achieve remission with initial therapy [3] and overall, >30% of DLBCL patients will ultimately relapse. There is currently no non-immunoglobulin somatic marker for predicting or for detecting relapse in the circulating blood before clinical evidence of relapse. Recently, whole exome sequencing in breast cancer [4] identified somatic mutations present in both tumor and circulating cell-free DNA (cfDNA). The advantages of using cfDNA for tumor mutation detection include: (i) noninvasive collection, (ii) availability at any time during disease course, (iii) real-time detection and monitoring of biomarker dynamics, and (iv) potentially fewer heterogeneity issues than tumor tissue testing.[4] In certain tumor types, biopsies are particularly difficult to obtain, especially in the case of PMBL or bone lymphoma. A noninvasive tool for the detection of somatic recurrent mutations, such as cfDNA, is thus valuable in these circumstances. Notably, the concept of 'liquid biopsy' was recently highlighted for the first time in a series of DLBCL patients, for whom high-throughput sequencing of a panel of target genes was performed, with successful detection of somatic variants both in the tumor and in the plasma.[5] These results indicate that cfDNA can be used to detect somatic variants in DLBCL, validating liquid biopsies in this type of tumor, even though it is not normally characterized by the presence of circulating tumor cells (CTCs) or leukemic phases.[6] Indeed, analysis of mutations in cfDNA has been described in many cancer types and could potentially serve as a biomarker of minimal residual

CONTACT Vincent Camus vincent.camus@chb.unicancer.fr Centre Henri Becquerel, rue d'Amiens, 76038 Rouen, France
Supplemental data for this article can be accessed at http://dx.doi.org/10.3109/10428194.2016.1139703.
© 2016 Taylor & Francis

disease (MRD), treatment efficacy, and disease relapse before clinico-radiological manifestations.[7–10] A recent study of many solid cancers in a large cohort of patients confirmed the use of digital polymerase chain reaction (dPCR) to search for somatic *KRAS* mutations in cfDNA and monitor the effect of targeted therapies by detecting newly developed *EGFR* mutations.[11] Several studies have demonstrated dPCR to be more sensitive than quantitative PCR (qPCR) for the detection of circulating biomarkers.[12,13] Furthermore, dPCR is fast, simple, economical, and consumes little DNA, making it a useful tool for plasma cfDNA analysis. We chose to develop dPCR assays for the detection of three recurrent mutations in DLBCL: (i) the exportin-1 (*XPO1*) E571K mutation, recently described as present in 31.8% of PMBL [14,15] potentially affecting sensitivity to Selective Inhibitors of Nuclear Exports (SINEs such as selinexor); (ii) the activating *EZH2* Y641 mutations, present in approximately 24% of GCB DLBCL [16,17] with a subset consisting of Y>N, and targetable by *EHZ2* inhibitors in development (EPZ-6438 [18]); and (iii) the oncogenically active *MYD88* L265P mutation found in 29% of ABC DLBCL,[19,20] potentially leading to a modulated response to ibrutinib.[21] The detection of these three mutations is potentially of great therapeutic impact in DLBCL, as their presence could aid in the stratification of patients most likely to benefit from targeted therapies.

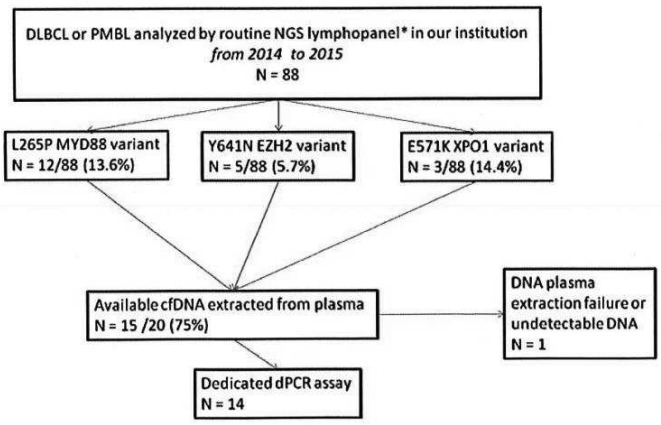
In this proof-of-concept study, we demonstrate that dPCR can be used to detect and quantify somatic mutations with high specificity in circulating cfDNA extracted from DLBCL patient plasma samples.

Materials and methods

Patients, samples, and DNA extraction

We retrospectively considered the patients treated for DLBCL and PMBL at the Henri Becquerel Center (Rouen, France) using available frozen tumor DNA and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples and concomitant EDTA plasma samples. Patients were selected if they had previously been analyzed by Next-Generation Sequencing (NGS) sequencing as part of routine analysis in the laboratory [16,19] and been identified as harboring one of the following mutations: *XPO1* E571K, *EZH2* Y641N, and *MYD88* L265P. All patients gave informed consent for specimen collection, clinical data collection, and biomarker analysis. GCB/non-GCB subclassification was determined by routine immunohistochemistry using Hans' algorithm.[22] A flow chart of the patients selected and analyzed is presented in Figure 1. In our study, 20/88 DLBCL patients (22.7%) harbored one of the selected mutations.

DNA was extracted from frozen or FFPE tumor tissues using proteinase K, followed by salt and ethanol precipitation and stored at −20 °C in 10 mM Tris–Cl and 1 mM EDTA (pH 8) buffer. Blood samples were collected in EDTA tubes and processed within two hours after collection, by centrifuging once at 2000 *g* (10 min) at 4 °C to isolate plasma, which was then stored at −80 °C. DNA was extracted from 1 ml of EDTA plasma using a QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit® (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Extracted cfDNA from each plasma sample



** As defined by Dubois et al. Oncotarget 2015,*

Figure 1. Flowchart representing patient selection.

Downloaded by [Rouen University] at 02:27 17 February 2016

Downloaded by [Rouen University] at 02:27 17 February 2016

was eluted in 40 µl of AVE buffer and then stored at −80 °C. Double-stranded DNA quantification was performed by a fluorimetric method using Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA).

All experiments were in accordance with the Helsinki Declaration and the study was approved by our internal review board.

Ion torrent personal genome machine (PGM) sequencing

Genomic DNA was submitted to Next Generation Sequencing (NGS) using a laboratory-developed 'Lymphopanel' set, designed to identify mutations in 34 genes important for lymphomagenesis as previously described.[5,16] This design covers 87 703 bases and generates 872 amplicons. Amplified libraries were submitted to emulsion PCR with the Ion OneTouch® 200 Template Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) using the Ion OneTouch® system according to the manufacturer's instructions. The generated Ion Sphere Particles (ISPs) were enriched with the Ion One Touch® Enrichment system and loaded and sequenced on Ion 316 v2 Chips (Life Technologies, Carlsbad, CA). PGM data analysis was performed as previously described.[16] Further verification by Sanger sequencing was performed using a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) and an ABI PRISM 3130 analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Development of a dPCR method for detection of XPO1 *E571K,* EZH2 *Y641N, and* MYD88 *L265P mutations*

The dPCR technique is based on the dilution and partitioning of a DNA sample into thousands of separate reaction units or compartments (microdroplets or nanometric wells) constituting as many individual PCR reactors, each partition containing a single copy or no copies of the target of interest.[23] The absolute number of copies of the DNA sequence of interest is directly estimated by the number of positive wells with the probe corresponding to the wild type or mutated sequence, each with a different fluorochrome.

A chip-based dPCR platform (QuantStudio3D® Digital PCR system; Life Technologies, Carlsbad, CA) was used for mutation detection. Mutation analysis in dPCR was based on a 5′-exonuclease assay using TaqMan®-MGB probes targeting the following mutations: *XPO1* E571K, *EZH2* Y641N, and *MYD88* L265P. dPCR was performed on DNA from tumor tissue and circulating cfDNA from plasma specimens at diagnosis. This dPCR platform allows the partitioning of input DNA into 20 000 consistently sized reaction wells (each containing 865 pl) on a chip. PCR reactions occur independently in individual wells, which are subjected to fluorescence reading after amplification. Each well is assigned as being positive or negative on the basis of the fluorescence signal, which is used to determine the existence of target DNA. The sequences of our designed Custom TaqMan® MGB probes and primers are listed in Supplementary Table 1. Each dPCR assay contained 36 µM of each primer and 8 µM of probes.

Due to the limited amount of cfDNA material available, preamplification of cfDNA was performed using our Custom TaqMan® primers and probes and TaqMan® Universal PCR Master Mix (no UNG). Each custom dPCR assay was used separately to preamplify 2 ng of cfDNA. As previously described, any intertarget bias introduced by preamplification is negligible, and the preamplified sample has essentially the same proportion of targets of interest as the sample prior to the amplification step.[24,25] Supplementary Table 1 shows two examples for each mutation to prove that preamplification produces no bias and does not significantly modify the proportion of targets of interest compared to the original sample. PCR cycling conditions and reagent compositions are described in Supplementary Table 5. Pre-amplified samples were diluted 10-fold in 1 × TE [10 mM Tris, 1 mM EDTA] 10:1, pH 8. Fifteen microliter aliquots of the PCR solutions were then loaded into QuantStudio3D® Digital PCR 20K chips and the PCR reaction was performed according to manufacturer instructions. Each dPCR run was performed with a blank control by adding water in place of template. We used in our experiments, as negative controls, normal genomic DNA (Promega® Corporation, Madison, WI) and wild type pre-amplified DNA. All samples were analyzed in a single assay for each mutation. After amplification on the Gene Amp 9700® PCR System, the QuantStudio3D® Digital PCR 20K chip (Life Technologies, Carlsbad, CA) was placed in a two-color FAM/VIC fluorescence detector (QuantStudio3D® Instrument, Life Technologies, Carlsbad, CA). The difference in fluorescence amplitude of wells where amplification did or did not occur (positive and negative samples, respectively) was used to divide the well population into four discrete clusters: FAM−/VIC − (no target), FAM−/VIC + (only wild-type (wt) DNA), FAM+/VIC − (only mutated (mt) DNA), FAM+/VIC + (both wt and mt DNA). FAM-signals are represented in blue, VIC-signals in red, FAM + VIC signals in green, and wells without any alleles (passive reference) are represented by ROX signals (yellow).

Analysis of the dPCR data for allele calling was performed with QuantStudio 3D AnalysisSuite® Software v1.1.3 (Life Technologies, Carlsbad, CA). All data were manually reviewed with relative quantification application which provides precise interpretation of data points

using scatter plots. The Variant Allele Fraction (VAF) was defined as the proportion of mutant DNA copies relative to the sum of mutant and wild-type DNA copies obtained by dPCR. Total copy number was systematically composed of between 200 and 2000 copies/µl per chip according to the manufacturer instructions.

To evaluate the sensitivity of the *XPO1* E571K, *EZH2* Y641N, and *MYD88* L265P dPCR assays, 20 ng of DNA from MedB-1 (harboring the *XPO1* mutation at heterozygous state), VAL (harboring the *EZH2* mutation at heterozygous state), and OCI-Ly3 (harboring the *MYD88* mutation at homozygous state) cell lines, respectively, were serially diluted with human wild-type reference genomic DNA (Promega® Corporation, Madison, WI) to achieve dilutions down to 0% of the mutant allele in wild type DNA background. No preamplification was performed for the dilution series. In order to establish the reproducibility of the dPCR method, experiments were independently performed in triplicate.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using MedCalc® for Windows, version 12.5 (MedCalc® Software, Ostend, Belgium). The relationships between molecular parameters were determined using a non-parametric test (Mann–Whitney), Pearson correlation coefficient (r) or a Fisher's exact test when appropriate. The differences between the results of the comparative tests were considered statistically significant if $p<0.05$.

Results

First, we evaluated the sensitivity of *XPO1*, *EZH2*, and *MYD88* mutant allele detection by dPCR using the genomic DNA (gDNA) extracted from MedB-1, VAL, and OCI-Ly3 cell lines, respectively. The mutant DNA from cell lines was mixed at different mutant allele concentrations (i.e. 50%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, and 0%) with wild-type reference DNA. dPCR detected the presence of all three mutations in dilutions down to 0.05%. We observed excellent reproducibility and strong correlations between the expected mutant allele frequencies and those measured by dPCR (r^2=0.9911, 0.9956, and 0.9503 for *XPO1* E571K, *EZH2* Y641N, and *MYD88* L265P assay, respectively, Supplementary Figure 1). Representative dPCR plots for *XPO1* E571K assay are shown in Figure 2. To assess the specificity of our dPCR assays, allele burden was measured in five preamplified cfDNA from control blood samples previously found negative for all three mutations by NGS. In this study, 0.051%, 0.054%, and 0.075% were considered to be the relevant thresholds [26] to discriminate positive versus negative samples for *XPO1* E571K, *EZH2* Y641N, and *MYD88* L265P assays, respectively (Supplementary Table 3). We also ran the three mutations across all selected patients by dPCR and we found no false positive results (Supplementary Table 4).

In this proof-of-concept study, dPCR analyses were not performed blinded to the tumor mutational status because cfDNA was only analyzed for the mutation harbored in the corresponding tumor, as determined by NGS.

In this study, dPCR and NGS showed 100% concordance for somatic mutation detection in plasma cfDNA, and VAFs were strongly correlated between both methods (r=0.99, $p<0.0001$). For 13 of 14 patients for whom one of the three mutations was detected in tumor DNA by NGS and for whom diagnostic plasma was available, the same mutation was detected in the matched cfDNA (See Table 1). Only one patient with non-GCB DLBCL who was positive for *MYD88* L265P in the tumor tissue did not have a detectable *MYD88* L265P mutation in the paired plasma by either dPCR or NGS. This patient displayed a stage I DLBCL with low tumor burden. The sensitivity of plasma cfDNA detection by dPCR was 100% (CI95%: 54.05–100%) for *XPO1* E571K, 100% (CI95%: 19.29–100%) for *EZH2* Y641N, and 80% (CI95%: 62.91–100%) for *MYD88* L265P. The specificity of plasma cfDNA detection by dPCR was 100%, as each mutation identified in plasma was also found in the corresponding tumor and we obtained no false positive results. We observed no correlation between plasma VAF and the quantity of double stranded circulating DNA (Qubit® dosage) (r=0.39, p=0.16), and no correlation between the VAF in the tumor and plasma at diagnosis (r=0.44, p=0.13). For patient N°8 with non-GCB DLBCL, follow-up samples were available and we observed a drastic decrease in the VAF of the MYD88 L265P mutation after two and four cycles of chemotherapy (2.57% and 0.09%, respectively), correlated with a complete clinical and metabolic remission and a drop in the quantity of circulating cfDNA (Table 2 and Figure 3). This patient received 4 cycles of induction chemotherapy consisting in: intravenous obinutuzumab, doxorubicine, bleomycine, vindesine, cyclophosphamide, methylprednisolone (GA101-ACVBP regimen), and PET after 4 cycles was negative. This patient next underwent consolidation chemotherapy with 2 cycles of intravenous high-dose methotrexate, 4 cycles of obinutuzumab, etoposide, ifosfamide, and 2 cycles of subcutaneous cytarabine.

Discussion

To our knowledge, this study is the first to report a noninvasive digital PCR (dPCR) detection method for somatic mutations in the cfDNA of DLBCL patients.

Downloaded by [Rouen University] at 02:27 17 February 2016

Downloaded by [Rouen University] at 02:27 17 February 2016

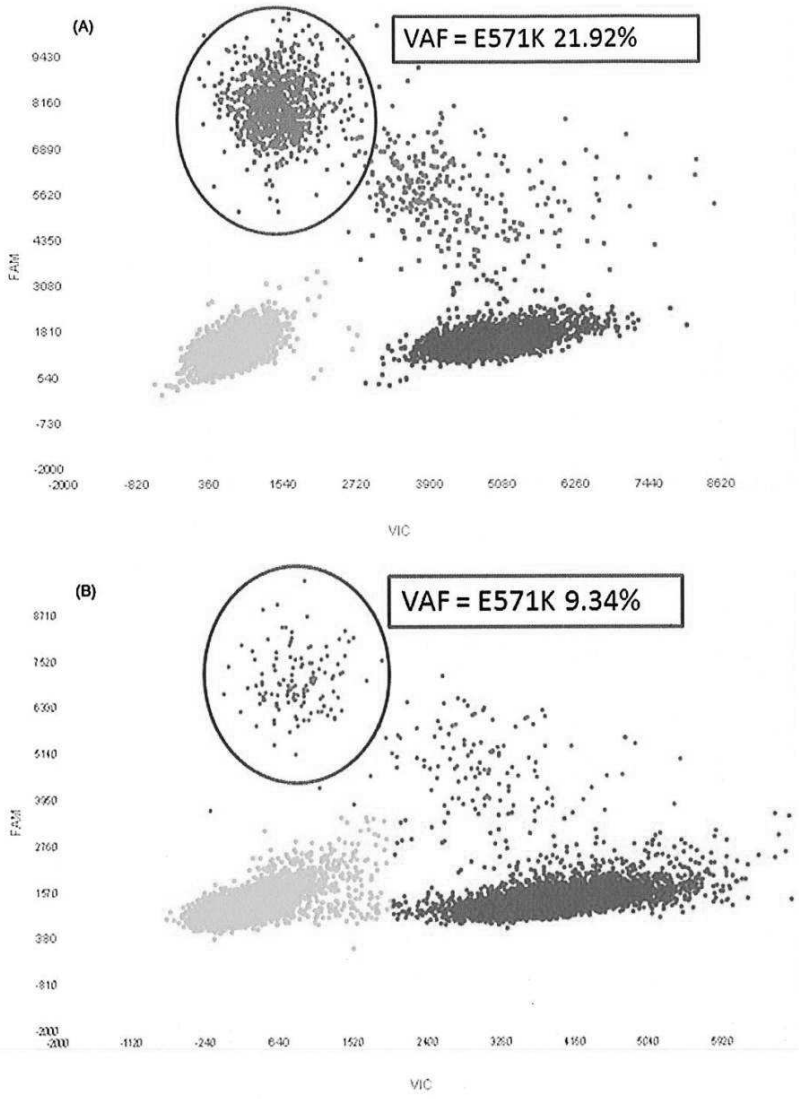


Figure 2. Representative views of digital PCR plots (mutant samples) for XPO1 E571K quantification in tumor (A) and plasma (B) for a PMBL patient (patient N°3) by dPCR. Data from sample chips are displayed in a scatter plot based on color of FAM and VIC events. Red, blue, green, and yellow plots represent wild-type alleles, mutant alleles, both alleles in the same well and no amplifications, respectively. VAF: Variant Allele Fraction.

We first investigated whether our dPCR assays were sufficiently sensitive to detect rare *XPO1*, *EZH2*, and *MYD88* mutations in cfDNA and showed that our dPCR assays have a sensitivity of 0.05% for mutation detections with very low false-positive rates. These results indicate that our probe-based dPCR assays are highly sensitive and specific for the detection of *XPO1* E571K, *EZH2* Y641N, and *MYD88* L265P somatic mutations in cfDNA, and prove the concept of 'liquid biopsy' in lymphoma patients. Only one of 14 cases was negative

Downloaded by [Rouen University] at 02:27 17 February 2016

Table 1. Comparative results between NGS and dPCR for allele burden quantification in tumor and plasma.

								Detection of mutations					
								In tumor			In cfDNA		
Patient	Sex	Age (years)	Stage	IPI	LDH>UPN	Bulky mass	Primary tumor histology	Gene	By Sanger	By NGS	By dPCR	By NGS	By dPCR	cfDNA concentration (ng/ml of plasma)
1	F	34	II	1	Yes	Yes	PMBL	XPO1	E571K	NA	E571K 30.17%	NA	E571K 2.26%	55.6
2	F	42	II	1	Yes	No	PMBL	XPO1	E571K	NA	E571K 42.94%	NA	E571K 0.12%	165.6
3	M	34	III	2	Yes	Yes	PMBL	XPO1	E571K	NA	E571K 21.92%	NA	E571K 9.34%	38.96
4	F	45	III	2	Yes	No	DLBCL GCB	EZH2	Y641N	Y641N 22.3%	Y641N 19.84%	Y641N 7%	Y641N 16.35%	59.2
5	F	66	III	4	Yes	No	DLBCL GCB	EZH2	Undetectable	Y641N 5.9%	Y641N 6.7%	Y641N 2.1%	Y641N 1.33%	77.6
6	M	83	IV	3	Yes	No	DLBCL non-GCB	MYD88	L265P	L265P 62.1%	L265P 62.06%	L265P 45%	L265P 51.59%	72.8
7	F	83	I	1	No	No	DLBCL non-GCB	MYD88	L265P	L265P 51.8%	L265P 51.6%	Undetectable	0%	24.72
8	M	53	IV	2	Yes	No	DLBCL non-GCB	MYD88	L265P	L265P 57.35%	L265P 54.07%	L265P 51.20%	L265P 53.72%	167.2
9	M	79	IV	2	No	No	DLBCL non-GCB	MYD88	L265P	L265P 62.48%	L265P 64.65%	L265P 0.27%	L265P 0.27%	32.24
10	F	72	IV	2	No	No	DLBCL GCB	MYD88	L265P	L265P 30%	L265P 28.15%	L265P 1.66%	L265P 3%	42.4
11	F	66	III	3	Yes	No	DLBCL non-GCB	MYD88	L265P	L265P 51.43%	L265P 56.54%	NA	L265P 25.98%	20.88
12	M	61	IV	3	Yes	No	DLBCL GCB	MYD88	L265P	L265P 34.39%	NA	NA	L265P 10.94%	20
13	F	84	IV	3	No	No	DLBCL non-GCB	MYD88	L265P	L265P 37.6%	L265P 41.14%	NA	L265P 3.62%	26
14	F	87	IV	2	No	No	DLBCL non-GCB	MYD88	L265P	L265P 11.89%	L265P 13.64%	NA	L265P 4.77%	19.28

IPI, international prognostic index; LDH, serum lactate dehydrogenase level; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; GCB; Germinal Center B-cell like; ABC, activated B-cell like; UPN, upper limit of normal; NGS, Next Generation Sequencing; dPCR, digital PCR; cfDNA, circulating cell-free DNA; PMBL, primary mediastinal large B cell lymphoma; F, female; M, male; NA, not available.

for dPCR plasma testing. One limitation of our retrospective study is that we had available only 1 ml aliquots of plasma for patients with low amount of cfDNA output which is limiting for MRD detection. For our future prospective study, we plan to extract 3 ml aliquots of plasma and to perform dPCR experiments with at least 4 ng of cfDNA for our experiments, which represents >1000 genome equivalents. Another limitation of our study is that our dPCR assay only enables the detection of one mutation (vs wild type) at a time. Multiplexing is limited by dPCR approaches but new dPCR technologies and platforms (including RainDance® or Biorad®) [27–30] are now available to overcome this weakness of the dPCR reported in the current work. However NGS strategies, although more costly and time-consuming, remain more performant than dPCR approaches.

This study confirms that dPCR technology is a powerful ally in the emerging context of noninvasive somatic mutation detection.[31,32] Indeed, dPCR boasts rapid implementation, low cost, short turnaround time, and high sensitivity, making it a valuable tool on its own and alongside NGS. In the near future, dPCR could potentially be a useful diagnostic tool, notably for lymphoma subtypes usually associated with poor biopsy quality, such as Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL) or PMBL: (i) PCNSL with *MYD88* L265P mutation detection,[33,34] (ii) PMBL with *XPO1* E571K mutation detection.[14]

In addition, previous studies [19,35–37] have demonstrated that targetable activating mutations are very frequent in GCB and ABC DLBCL, indicating that looking for a limited number of somatic mutations in plasma cfDNA could help tailor optimal treatment strategies in DLBCL, at a time when many pharmacological inhibitors are in development. dPCR is useful for the detection and follow-up of potentially actionable mutations that can be specifically targeted in DLBCL patients: *XPO1* with selinexor,[38] *EZH2* with EPZ-6438,[18,39] and *MYD88* with ibrutinib.[21] The molecular aberrations of the NF-κB pathway, including *MYD88* L265P mutations, have important implications as therapeutic targets in DLBCL. Patients harboring such mutations are thought to be less sensitive to *MYD88* pathway inhibitors, as suggested by studies showing that inhibition of *MYD88* and downstream targets including *IRAK1*, *IRAK4*, *BTK*, and *TAK1* can suppress downstream NF-κB signaling.[40] Indeed, ibrutinib has been shown to have less single agent activity in *MYD88* L265P mutants.[21,40] Investigation of *MYD88* mutation status may therefore help identify patients who could benefit from *MYD88* pathway targeted therapies. However, dPCR technology is applicable only for the detection of well-defined recurrent

Table 2. Follow-up analysis of cfDNA from blood samples of patient N°8.

Detection of MYD88 L265P mutation (VAF) in cfDNA for patient N°8								
At diagnosis			Mid-treatment (after 2 cycles of chemotherapy)			End of treatment (after 4 cycles of chemotherapy)		
By NGS	By dPCR	cfDNA concentration (ng/ml of plasma)	By NGS	By dPCR	cfDNA concentration (ng/ml of plasma)	By NGS	By dPCR	cfDNA concentration (ng/ml of plasma)
51.20%	53.72%	167.2	2.80%	2.57%	70	0.08%	0.09%	31.84

NGS, Next Generation Sequencing; dPCR, digital PCR; cfDNA, circulating cell-free DNA; VAF, Variant Allele Fraction.

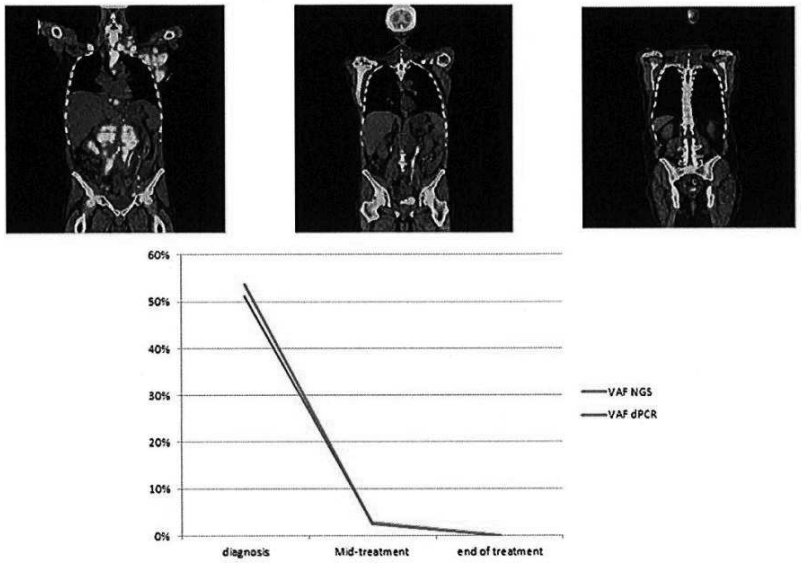


Figure 3. Results of the monitoring of the MYD88 L265P mutation VAF in plasma cfDNA of patient N°8 at diagnosis, mid-treatment (after 2 cycles of induction chemotherapy) and at the end of treatment (after 4 cycles of induction chemotherapy), as determined by NGS and dPCR, correlated with $^{18\text{-}F}$Fluorodeoxyglucose (FDG) Positron Emission Tomography (PET).

point mutations. Altogether, *MYD88* L265P, *EZH2* Y641N, and *XPO1* E571K are observed in approximately 20% of DLCBL.[41] Other recurrent point mutations targeting *CD79B* (7.4%) or *STAT6* (5.9%) are also recurrent and could be included in an extended dPCR design. By comparison, Lymphosight® technology,[42] based on the quantification of clonotypic immunoglobulin rearrangements, can be used more widely and predict relapse in DLBCL patients,[32] but VDJ rearrangement is not detectable in all patients (immunoglobulin-negative phenotype of PMBL [43]) and the technology is not useful to tailor a targeted therapy. Another limitation of our study using single point mutations for MRD is subclonality, in particular for actionable alterations. Effective treatment might eradicate those subclones and mutation-negative clones could persist yet be undetectable by this assay. In the context of non-targeted therapies, Jiang Y et al. have demonstrated that DLBCL relapse could occur according to either an early (displaying a distinct set of somatic mutations) or a late divergent mode (sharing most of the mutations with the initial tumor), irrespectively of the Germinal Center like or activated B-cell like classification. This work indicates that driver mutations such as *MYD88* or *EZH2* variants are likely to be detected at the time of relapse. In the context of *MYD88/XPO1/EZH2* targeted therapies we do not yet have clear answers regarding clonal evolutions and the dPCR we propose in the current work therefore represents a useful tool to monitor patients.

Our study was a pilot study of feasibility and demonstrated the possibility of detection of somatic mutations in the plasma by dPC, which is a simple, sensitive, and specific technique. Confirmation of a role in terms of monitoring of MRD, not restricted to the three selected mutations, and assessment of the interest of a simultaneous detection of a panel of recurrent

Downloaded by [Rouen University] at 02:27 17 February 2016

mutations in DLBCL, as potential companion tests for targeted therapies, will be performed through a dedicated prospective study: LymphoSeq study (NCT02339805) currently underway. The primary end point of this ongoing prospective study is to assess the applicability of monitoring for tumor-associated genetic aberrations in cfDNA during DLBCL treatment and follow-up by NGS and dPCR.

In conclusion, this proof-of-concept study demonstrates for the first time that the detection and quantification of recurrent somatic mutations in the plasma of patients with DLBCL by dPCR is feasible, simple, and reproducible. cfDNA testing by dPCR appears to be a useful and valuable molecular tool in the management of DLBCL, side by side with NGS methods. These preliminary and retrospective results should be confirmed in an ongoing prospective clinical trial (NCT02339805).

Acknowledgements

The authors would like to thank all the patients who provided samples for the study.

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at http://dx.doi.org/10.3109/10428194.2016.1139703.

References

[1] Tilly H, Vitolo U, Walewski J, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2012;23:vii78–vii82.

[2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer J Int Cancer. 2015;136:E359–E386.

[3] Friedberg JW. Relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. Hematol Am Soc Hematol Educ Program. 2011;2011:498–505.

[4] Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. J Clin Oncol. 2014;32:579–586.

[5] Bohers E, Viailly PJ, Dubois S, et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by Next Generation Sequencing reflect the genetic changes in both Germinal Center B-cell like and activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma tumors at the time of diagnosis. Haematologica. 2015;100:e280–4. DOI: 10.3324/haematol.2015.123612.

[6] Mancuso P, Calleri A, Antoniotti P, et al. If it is in the marrow, is it also in the blood? An analysis of 1,000 paired samples from patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. BMC Cancer. 2010;10:644.

[7] Jung K, Stephan C, Lewandowski M, et al. Increased cell-free DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer. Cancer Lett. 2004;205:173–180.

[8] Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2003;21:3902–3908.

[9] Frattini M, Gallino G, Signoroni S, et al. Quantitative analysis of plasma DNA in colorectal cancer patients: a novel prognostic tool. Ann N Y Acad Sci. 2006;1075:185–190.

[10] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res. 1977;37:646–650.

[11] Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci Transl Med. 2014;6:224ra24.

[12] Goh H-G, Lin M, Fukushima T, et al. Sensitive quantitation of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia using nanofluidic digital polymerase chain reaction assay. Leuk Lymphoma. 2011;52:896–904.

[13] Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. Nat Methods. 2013;10:1003–1005.

[14] Jardin F, Pujals A, Pelletier L, et al. Whole exome sequencing of refractory aggressive B-cell lymphomas identified recurrent mutations of the exportin-1 gene (XPO1) in primary mediastinal B-cell lymphoma subtype. A LYSA study [abstract]. Hematol Oncol. 2015;33(suppl S1):100–180 [Abstract 048].

[15] Mareschal S, Dubois S, Viailly P-J, et al. Whole exome sequencing of relapsed/refractory patients expands the repertoire of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma: exome sequencing of refractory DLBCL. Genes Chromosomes Cancer. 2016;55:251–267. DOI: 10.1002/gcc.22328.

[16] Dubois S, Mareschal S, Picquenot J-M, et al. Immunohistochemical and genomic profiles of diffuse large B-cell lymphomas: implications for targeted EZH2 inhibitor therapy? Oncotarget. 2015;6:16712–16724.

[17] McCabe MT, Ott HM, Ganji G, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. Nature. 2012;492:108–112.

[18] Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, et al. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. Mol Cancer Ther. 2014;13:842–854.

[19] Bohers E, Mareschal S, Bouzelfen A, et al. Targetable activating mutations are very frequent in GCB and ABC diffuse large B-cell lymphoma. Genes Chromosomes Cancer. 2014;53:144–153.

[20] Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. Nature. 2011;470:115–119.

[21] Wilson WH, Young RM, Schmitz R, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. Nat Med. 2015;21:922–926. DOI: 10.1038/nm.3884.

[22] Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Blood. 2004;103:275–282.

[23] Baker M. Digital PCR hits its stride. Nat Methods. 2012;9:541–544.

[24] Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, et al. Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. Clin Cancer Res. 2014;20:2643–2650.

[25] Sefrioui D, Perdrix A, Sarafan-Vasseur N, et al. Short report: monitoring ESR1 mutations by circulating tumor DNA in aromatase inhibitor resistant metastatic breast

Downloaded by [Rouen University] at 02:27 17 February 2016

cancer. Int J Cancer. 2015;137:2513–2519 DOI: 10.1002/ijc.29612.
[26] Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. Clin Biochem Rev. 2008;29:S49–S52.
[27] Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. Sci Transl Med. 2015;7:313ra182.
[28] Taly V, Pekin D, Benhaim L, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. Clin Chem. 2013;59:1722–1731.
[29] Tone AA, McConechy MK, Yang W, et al. Intratumoral heterogeneity in a minority of ovarian low-grade serous carcinomas. BMC Cancer. 2014;14:982.
[30] Laurent-Puig P, Pekin D, Normand C, et al. Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2015;21:1087–1097.
[31] Dawson S-J, Seymour JF. Large B-cell lymphoma: is the future written in the blood? Lancet Oncol. 2015;16:481–483.
[32] Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. Lancet Oncol. 2015;16:541–549.
[33] Yamada S, Ishida Y, Matsuno A, et al. Primary diffuse large B-cell lymphomas of central nervous system exhibit remarkably high prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations. Leuk Lymphoma. 2015;56:2141–2145. DOI: 10.3109/10428194.2014.979413.
[34] Bonzheim I, Giese S, Deuter C, et al. High frequency of MYD88 mutations in vitreoretinal B-cell lymphoma: a valuable tool to improve diagnostic yield of vitreous aspirates. Blood. 2015;126:76–79.
[35] Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 2000;403:503–511.
[36] Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. Nature. 2009;459:717–721.
[37] Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. Nature. 2010;463:88–92.
[38] Hing ZA, Mantel R, Beckwith KA, et al. Selinexor is effective in acquired resistance to ibrutinib and synergizes with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2015;125:3128–3132.
[39] Ribrag V, Soria J, Reyderman L, et al. Phase I study of E7438 (EPZ-6438), an enhancer of zeste-homolog 2 (EZH2) inhibitor: dose determination and preliminary activity in non-Hodgkin lymphoma [abstract]. Hematol Oncol. 2015;33(suppl S1):100–180 [Abstract 145].
[40] Chaudhary D, Werner L, Improgo R, et al. Effect of MYD88 mutation in CLL on IRAK4 and BTK inhibition in vitro. Blood. 2013;122:4132–4132.
[41] Caner V, Sen Turk N, Baris IC, et al. MYD88 expression and L265P mutation in mature B-cell non-Hodgkin lymphomas. Genet Test Mol Biomarkers. 2015;19:372–378.
[42] Kurtz DM, Green MR, Bratman SV, et al. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. Blood. 2015;125:3679–3687.
[43] Leithäuser F, Bäuerle M, Huynh MQ, et al. Isotype-switched immunoglobulin genes with a high load of somatic hypermutation and lack of ongoing mutational activity are prevalent in mediastinal B-cell lymphoma. Blood. 2001;98:2762–2770.

Downloaded by [Rouen University] at 02:27 17 February 2016

Annexe 8 – Manuscrit original, en révision dans la revue *Haematologica*

Title: Detection and prognostic value of recurrent *XPO1* mutations in tumor and cell-free circulating DNA of patients with classical Hodgkin Lymphoma.

Vincent Camus (1)(2), Aspasia Stamatoullas (1)(2), Sylvain Mareschal (2), Pierre-Julien Viailly (2), Nasrin Sarafan-Vasseur (3), Elodie Bohers (2), Sydney Dubois (2), Jean Michel Picquenot (2)(4), Philippe Ruminy (2), Catherine Maingonnat (2), Philippe Bertrand (2), Marie Cornic (4), Valérie Tallon-Simon (6), Stéphanie Becker (7), Liana Veresezan (4), Thierry Frebourg (3), Pierre Vera (7), Christian Bastard (2)(5), Hervé Tilly (1)(2) and Fabrice Jardin (1)(2).

(1) Department of Hematology, Centre Henri Becquerel, Rouen, France
(2) INSERM U918, Centre Henri Becquerel, University of Rouen, Rouen, France
(3) INSERM U1079, University of Rouen, Rouen, France
(4) Department of Pathology, Centre Henri Becquerel, Rouen, France
(5) Department of Genetic Oncology, Centre Henri Becquerel, Rouen, France
(6) Clinical Research Unit, Centre Henri Becquerel, Rouen, France
(7) Department of Nuclear Medicine and Radiology, Centre Henri Becquerel and QuantIF (Litis EA4108 – FR CNRS 3638), Rouen, France

Abbreviated title: *XPO1* mutations in classical Hodgkin Lymphoma

Corresponding author: Fabrice Jardin

Email: fabrice.jardin@chb.unicancer.fr

Phone: +33(0)232082465

Fax: +33(0)232082283

Institution: Centre Henri Becquerel and INSERM U918, Rouen, France.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this manuscript

Overall word-count: 3391
Abstract word-count: 203
Number of figures : 4
Number of tables : 1
Number of references : 50

Abstract

Classical Hodgkin's lymphoma is one of the most common lymphomas and shares clinical and genetic features with primary mediastinal B-cell lymphoma. In this retrospective study, we analyzed the recurrent hotspot mutation of the exportin 1 (*XPO1*, p.E571K) gene, previously identified in primary mediastinal B-cell lymphoma, in biopsies and plasma circulating cell-free DNA from patients with classical Hodgkin's lymphoma using a highly sensitive digital PCR technique. A total of 94 patients were included in the present study. This widely expressed *XPO1* E571K mutation is present in one quarter of classical Hodgkin's lymphoma patients (24.2%). Mutated and wild-type classical Hodgkin lymphomas were similar regarding the main clinical features. Patients with a detectable *XPO*1 mutation at the end of treatment displayed a tendency toward shorter progression-free survival, as compared to negative patients (2-years progression free-survival: 57.1%, 95% confidence interval: 30.1%-100% versus 2-years progression free-survival: 90.5%, 95% confidence interval: 78.8%-100% respectively, p=0.0601). To conclude, the detection of the *XPO1* E571K mutation in biopsy and plasma cell-free DNA by digital PCR may be used as a novel biomarker in classical Hodgkin's lymphoma for both diagnosis and minimal residual disease and pinpoints a crucial role of *XPO1* in classical Hodgkin's lymphoma pathogenesis. The detection of somatic mutation in the plasma cell-free DNA of patients represents a major technological advance in the context of liquid biopsies and noninvasive management of classical Hodgkin lymphoma.

Key words: classical Hodgkin Lymphoma, exportin-1 (XPO1), digital PCR, circulating DNA

Introduction

Hodgkin's lymphoma (HL) is one of the most frequent lymphomas in the world, accounting for 10% of newly diagnosed lymphomas and 1% of all cancers, with an incidence of about 3 cases per 100,000 people per year in western countries.[1] HL has been classified into classical HL (cHL), which accounts for 95% of all cases, and the rare nodular lymphocyte-predominant HL, which is considered to be a distinct entity.[2] The majority of cHL cases are diagnosed in 20-30 year old patients, with a second smaller peak in adults older than 55 years.[3] cHL is further subdivided into four subtypes: nodular sclerosis (60% of cases), mixed cellularity (30% of cases), lymphocyte-depleted and lymphocyte-rich HL.[4] cHL patients have greatly benefited from multi-agent chemotherapy and improved radiation techniques and 65%-90% of patients can achieve disease-free survival after five years, depending on stage and clinical risk factors.[5] Those with a rapid response to initial treatment have the best outcomes and may benefit from truncated, less-toxic treatment regimens.[6] Nevertheless, approximately 20-25% of patients will ultimately experience either primary refractoriness to chemotherapy (within 3 months of doxorubicin-based chemotherapy), early disease relapse (within 12 months after the end of first-line treatment) or late disease relapse[7], underlying the need to understand the mechanisms involved and to identify predictive biomarkers.

The singularity of cHL is that tumor cells, designated as Hodgkin and Reed-Sternberg cells (HRS cells), usually account for only about 0.1-2% of cells in the tissue.[8] The scarcity of HRS cells, embedded in an extensive inflammatory infiltrate, hampers their molecular analysis and the genomic landscape of cHL remains largely unknown. Constitutive activation of the NF-kB pathway in HRS cells has been demonstrated by targeted analyses using laser capture microdissection (LCM)[9,10] or cell sorting by flow cytometry.[11] Genomic gains of *REL*, encoding an NF-kB factor, are present in about 30% of cases,[12,13] and β-2-microglobulin (B2M) is frequently mutated in cHL, strongly associated with nodular sclerosis subtype and better overall survival.[11]

We recently detected an unexpected recurrent point mutation of *XPO1* (exportin 1) (also known as *CRM1*: Chromosome Region Maintenance 1) located in exon 15 (c.1711G>A) leading to the Glu571Lys (p.E571K) missense substitution in relapsed/refractory (R/R) Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma (PMBL) patients included in the LYSA LNH03 trial program.[14,15] PMBL are well known to share several genetic features with cHL, including mutations in *SOCS1,*[16] *STAT6*[17] and *PTPN.*[16] XPO1 is a member of the importin-β superfamily of nuclear export receptors (also termed Karyopherins) that mediates the translocation of numerous RNAs and cellular regulatory proteins, including tumor suppressor proteins (TSPs) such as p53, BRCA1, Survivin, NPM, APC and FOXO. The exportin-1 hydrophobic groove binds to the leucine-rich nuclear export signal (NES) domain of its cargo proteins. Importantly, Selective Inhibitors of Nuclear Export (SINEs), a new class of small molecule inhibitors, have been shown to effectively target XPO1 and retain TSPs in the nucleus and are currently being evaluated in phase 1 and 2 clinical trials for various cancer types.[18,19] This *XPO1* E571K mutation has been detected in approximately 25% of PMBL cases but at a lower frequency (1/10) in sorted HRS cells.[11] Because of the scarcity of HRS cells in biopsies of patients with cHL, finding recurrent mutations could be easier in the plasma cfDNA of these patients, with potentially fewer heterogeneity issues than tumor tissue testing. Furthermore, the concept of "liquid biopsy" was recently highlighted in a series of Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL) patients, for whom high-throughput sequencing of a panel of target genes was performed, with successful detection of somatic variants both in the tumor and in the plasma.[21] Tumor circulating cfDNA has also been detected in the plasma of cHL patients[22]. Notably, Oki et al.[23] successfully detected tumor specific immunoglobulin gene segments in blood indicating that the principle of liquid biopsy may also be relevant for cHL patients. We recently designed a highly sensitive and specific probe-based digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) assay for the detection of *XPO1* E571K somatic mutations in plasma cfDNA[24] that could be used as a tool to detect minimal residual disease (MRD).

In this study, we investigated the prevalence and clinical relevance of *XPO1* E571K in cHL cases and demonstrated that this recurrent mutation was detectable in both tumor and plasma, indicating that *XPO1* mutations represent a new genetic biomarker, useful at the time of diagnosis or as a MRD marker.

Methods

Patients

We retrospectively considered adult patients treated for cHL at the Henri Becquerel Center (Rouen, France) between 2009 and 2015 using available frozen tumor DNA and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples. According to these inclusion criteria, 94 patients were included in the present analysis (FFPE samples: n=13; frozen tumor samples, n=81). Among these 94 patients, 50 were previously included in a biological monocentric prospective trial that aimed to assess the kinetics of cytokines (N° RCB 2009-A01117-50). These 50 patients ("cytokines" cohort) were included in this trial between 2010 and 2012 and had serial EDTA plasma samples, obtained from blood collection (**Supplementary Methods**) concomitant with the diagnostic biopsy and at end of chemotherapy/radiotherapy treatment. All experiments were performed in accordance with the Helsinki Declaration and the study was approved by our internal review board (N° 1601B). All patients gave informed consent for specimen collection, clinical data collection and biomarker analysis.

dPCR experiments

A chip-based dPCR platform (QuantStudio3D® Digital PCR system; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) was used for mutation detection. Mutation analysis with dPCR was based on a 5'-exonuclease assay using TaqMan®-MGB probes targeting the *XPO1* E571K mutation. dPCR was performed on DNA from tumor tissue and circulating cfDNA from plasma specimens at diagnosis and at end of treatment. The sequences of our designed Custom TaqMan® MGB probes and primers are listed in **Supplementary Table 1**.

To consolidate results obtained using this dPCR plateform we also analyzed all samples using a distinct droplet-based dPCR (ddPCR^{TM}) platform (Qx200® droplet digital PCR system, Bio-rad laboratories, Hercules, CA, USA) using the same *XPO1* dPCR assay, according to manufacturer's instructions. PCR cycling conditions and reagent compositions are described in **Supplementary Table 2.** To assess the

specificity of our dPCR assay with the ddPCR platform, allele burden was measured in twenty preamplified cfDNA samples from DLBCL control blood samples previously found negative for the mutation by NGS. In this study, 0.1% was considered to be the relevant threshold[25] to discriminate positive versus negative samples for *XPO1* E571K by dPCR (**Supplementary Table 3**).

Ion torrent personal genome machine™ (PGM) sequencing

In the aim to validate results obtained by dPCR technologies, Next Generation Sequencing (NGS) experiments were performed using Ion Torrent Personal Genome Machine™ (PGM, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Libraries were prepared from 10 ng of genomic DNA with primers from our previously reported Lymphopanel[21,26] targeting the *XPO1* E571K nucleotide variant **(Supplementary Methods).**

Response evaluation and PET-CT

Responses after treatment were determined according to the International Workshop Group Response (Cheson) criteria.[27] PET results were reported using the Deauville 5-point scale (**Supplementary Methods**).

Statistical analysis

The relationships between clinical and molecular parameters were assessed using non-parametric tests: Mann-Whitney U test, Kendall's tau correlation coefficient or the associated test or Fisher's exact test when appropriate. Results of the comparative tests were considered statistically significant if $p<0.05$. All statistical analyses were performed using R software v3.0.2.

Results

Mutations of *XPO1* in cHL at the time of initial diagnosis

The main clinical features of the patients are summarized in **Table 1**. Patients were considered mutated if they had an *XPO1* E571K mutation in their biopsy-extracted DNA. The mutation was found at a frequency

of 24.2% in biopsy-extracted DNA by dPCR (**Table 1**). In this series of 94 cHL patients, the main clinical features at the time of diagnosis, including age, sex-ratio, stage and mediastinal involvement were similar between mutated and wild-type cases (**Table 1**).

The concordance of the *XPO1* E571K mutation dPCR results within the 50 biopsy/ plasma DNA pairs was highly significant (p=0.0179 Fisher's exact test, **Supplementary Table 4**). PGM targeted sequencing analysis, carried out on the still available 48 DNA samples extracted from the "cytokines" cohort's biopsies, confirmed dPCR results in 40/42 (NI = 6) cHL (p<0.0001, Fisher's exact test, **Supplementary Table 5 and 6**) and VAF were strongly correlated (Kendall's tau coefficient= 0.751, p=0.000193, **Supplementary Figure 1**). Digital PCR generates more copies (analysis points) of the sequence of interest than PGM (mean 16000 points by dPCR versus mean 4800 reads by PGM, data not shown), so the accuracy of the VAF might be lower by PGM than by digital PCR. The cases of discrepancies between PGM and digital PCR results involved FFPE DNA samples whose amplification by PGM is more difficult, with lower sequencing depth. The *XPO1* mutation was also investigated by dPCR in DNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of 4 mutated patients, and was not found in those samples (n=0/4, data not shown).

The E571K *XPO1* mutation VAF in biopsy-extracted DNA ranged from 0.13% to 4.78% (median 0.435%). The VAF in plasmatic cfDNA ranged from 0.13% to 14.74% (median 0.24%, **Supplementary Table 7**). Correlation between cfDNA VAF and tumor DNA VAF was low but significant (Kendall's tau= 0.289, p=0.00931, **Figure 3**). This highlights the fact that, although HRS cells in the tumor are very sparse, the mutation frequencies seem to be correctly represented in the plasma.

There was a trend toward higher cfDNA concentration (ng/mL of plasma) in advanced stage disease than in localized disease (p=0.0894, **Supplementary Figure 2**) but no correlation between cfDNA concentration and *XPO1* mutation VAF (p=0.735, **Supplementary Figure 3**). *XPO1* mutations were found in both mixed cellularity and nodular sclerosis subtypes, indicating that the mutation is not a feature of a specific histological subtype. No *XPO1* mutations were detected in the only lymphocyte-rich cHL case of the cohort (**Table 1**).

Of note, 5 patients displayed the *XPO*1 mutation exclusively in the tumor DNA biopsy (**Supplementary Table 4**); three of these 5 patients had a localized stage II disease with small tumor size (4-6 cm diameter), whereas the remaining two patients had advanced stage disease (one stage III, one stage IV). Furthermore, 8 patients had an *XPO1* mutation only detectable in the cfDNA. These results illustrate that considering only tumor biopsy DNA may lead to an underestimation of the mutation prevalence, and suggest that joint analysis of cfDNA and biopsy-extracted DNA is more suitable to detect *XPO1* mutations in cHL.

Cell lines analysis

We also analyzed 6 HL-derived cell lines by dPCR and PGM : KM-H2 (DSMZ: ACC 8), HDLM-2 (ACC 17), L-540 (ACC 72), L-428 (ACC 197), L-1236 (ACC 530), U-H01 (ACC 626) and we found the *XPO1* E571K mutation in L-1236 and U-H01 cell lines, with VAF of 18.5% and 85% respectively (**Supplementary figure 4**). The karyotype of L-1236 and U-H01 cell lines revealed amplification of the 2p15 - 2p16 region where *XPO1* is located (chr2:61703069-61767418:2p15 region). Our data are in favor of duplication of the mutated *XPO1* allele in the U-H01 cell line and of the wild-type allele in L-1236 cell line. We did not find any other *XPO1* variants within exons 15 to 18.

Response rate and survival analysis

The complete remission rate at the end of treatment (85.7% versus 80%, p=0.537) was similar in MT and WT patients. There was no statistically different rate of positivity of interim PET-CT after two cycles (C2) of chemotherapy (PET-2) in MT patients as compared with WT patients (41.2% versus 21.95% p=0.197). Concerning survival analysis, with a median follow-up of 34.5 months, OS and PFS were similar between MT and WT patients with 2-year OS and PFS probability of 95% [CI95%: 85.9%-100%] and 82.2% [CI95%:67.8%-99.7%] respectively in MT patients and of 98.1% [CI95%: 94.5%-100%] and 64.8% [CI95%: 52.9%-79.5%] respectively in WT patients (p=0.637 and 0.248 for OS and PFS respectively, **Supplementary Figure 5**). Of note, PET-2-positive patients had a shorter 2y-PFS, as compared to PET-2-

negative patients (2y-PFS=62.5%, CI95%:42.8%-91.4% versus 2y-PFS=86.1%, CI95%:75.5%-98.2% respectively, p=0.00159, **Supplementary Figure 6**).

cfDNA as a biomarker for MRD

Plasma cfDNA at the end of treatment was analyzed for 28 patients; the remaining 66 patients had either no available plasma sample at end of treatment (n=46), or no *XPO1* mutation at diagnosis in either the plasma or the biopsy (n=20). **Figure 1** schematically shows the variation of the *XPO1* E571K mutation VAF in the plasma cfDNA of the 28 evaluable patients between diagnosis and completion of treatment, with PET-CT at C2 and end of treatment. For the majority of patients (n = 20), the cfDNA VAF decreased between diagnosis and completion of treatment. The mutation became undetectable (using the threshold of 0.1%) in plasma for 16 patients. Five patients had plasma cfDNA with undetectable *XPO1* E571K mutation at diagnosis and at end of treatment ("negative" patients, **Figure 1**) but were mutated in biopsy-extracted DNA. Patients with a detectable *XPO1* mutation at the end of treatment displayed a trend toward shorter 2y-PFS, as compared to negative patients (2y-PFS=57.1%, CI95%:30.1%-100% versus 2y-PFS=90.5%, CI95%:78.8%-100% respectively, p=0.0601, **Figure 2**). Furthermore, patients with increasing cfDNA VAF at end of treatment (n=3/28) seem to display shorter OS and PFS but the sample size is too low to conclude with certainty (2y-PFS=33.3%, CI95%:6.7%-100% versus 2y-PFS=90%, CI95%:77.8%-100% respectively, p=0.0439, data not shown). Of note, in 2/3 cases, PET was negative at the time of the MRD increase detection. In the full cohort of 94 patients, 26 patients experienced relapse during follow-up. Of the 7 patients with a positive plasma at end of treatment, 4 patients (57%) relapsed during follow-up (**Figure 2**), which suggests that the assessment of plasma might be more sensitive than PET because only one patient had a positive PET at end of treatment.

Finally, 1 patient (patient N°42) had an *XPO1* E571K mutation at diagnosis in both biopsy and plasma samples as well as in cfDNA at end of treatment (VAF 4.04%, 0.91% and 0.19% respectively, **Supplementary Figure 7**). The mutation was also detected in plasma cfDNA 3 months after the end of

treatment (VAF 0.12%) and in the relapse biopsy 10 months after the end of 1st line ABVD chemotherapy (VAF relapse 2%, **Figure 4**). Unfortunately, we were unable to extract plasma cfDNA at relapse for this patient.

Discussion

Herein we describe for the first time the existence of a widely present *XPO1* E571K somatic mutation in a large cohort of patients with cHL, as identified by dPCR and confirmed by NGS experiments. In total, 24.2 % of our patients with cHL harbored the *XPO1* E571K mutation. The detection of this mutation in the plasma cfDNA of patients represents a major technological progress in the onset of liquid biopsies in Hodgkin's lymphoma.

There is a pathological overlap between PMBL and specifically cHL of the nodular sclerosis subtype; whether both might derive from thymic B cells is currently an area of discussion.[28] The fact that the *XPO1* E571K mutation is so enriched in both of these subtypes reinforces the hypothesis of a common origin and a strong oncogenic role of this gene. Missense substitutions targeting *XPO1* have previously been also reported at a low frequency (<5%) in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), suggesting that these mutations may also play a role in several oncogenic processes.[29–31] Importantly, alternative *XPO1* variants including those located at the hotspot[14,15,32,33] were not assessed by our dPCR approaches and we may have underestimated the rate of *XPO1* mutations in cHL. Nevertheless, we did not detect those alternative *XPO1* variants by NGS on cLH biopsies. To date, the role of *XPO1* and the impact of the highly selected E571K mutation in the pathogenesis of cHL remain totally unknown. Several proteins known to play a major role in cHL oncogenesis, including STAT1/STAT6, FOXO1 or CIITA are also identified as cargo proteins.[34–36] Whether the *XPO1* mutations may interfere with the nucleus/cytoplasm shuttle of these proteins remains to be determined.

Genomic analyses of HL have been hampered until recently by the scarcity of HRS cells that are tremendously thinned out (to 1%) by a very large number of robust, nonmalignant infiltrating inflammatory

cells that include macrophages, reactive lymphocytes, plasma cells and fibroblasts.[4] Reactive infiltrating cells, especially T cells, usually make up at least 99% of the cells in the tumor mass,[37] which may explain the low *XPO1* E571K VAF observed in our series of cHL patients. We cannot affirm that the mutation in *XPO1* is indeed present in HRS cells and not in some bystander cells but the presence of the mutation in two Hodgkin cell lines and its absence in PBMC are in favor of the presence of this *XPO1* mutation in HRS tumor cells specifically. The *XPO1* E571K mutation in L-1236 cell line was first detected by whole-exome sequencing.[38]

In this particular disease, highly sensitive techniques like dPCR and targeted NGS are essential to highlight low frequency mutations. High-throughput techniques such as low-coverage whole genome sequencing, [39] sequencing of circulating cfDNA[22] or targeted exome sequencing of isolated HRS cells[11] have recently helped to investigate genetic lesions underlying cHL but sample sizes were very low. Whole-exome sequencing (WES) based experiments of sorted Reed-Sternberg (RS) cells[11,40,41] recently identified new point mutations in cHL cases, including several mutations already reported in PMBL, such as *CIITA*, *SOCS1*, *STAT6* and *B2M* mutations, as well as one case harboring the E571K *XPO1* mutation but this study was restricted to 10 cases,[11] with an insufficient median depth of sequencing (48X), potentially limiting for the discovery of genomic alterations.

A recent NGS study on circulating cfDNA of nine nodular sclerosis HL cases showed genomic imbalances in HRS cells that can be identified at diagnosis with rapid normalization of circulating cfDNA profiles upon therapy initiation, suggesting a potential role for circulating cfDNA profiling in early response monitoring.[22] Although cHL is curable even in advanced stages, up to 20% of patients will not be cured or achieve remission with initial therapy[7] and overall, over 25% of cHL patients will ultimately relapse, warranting the identification of a specific and trackable biomarker. In the present study, we performed highly sensitive analysis of a large cohort of 94 cHL patients and showed a recurrent *XPO1* E571 somatic point mutation that could be considered as a new biomarker in approximately one quarter of cHL patients. In line with this aspect we have identified a trend toward unfavorable prognostic impact in terms of PFS in patients with detectable *XPO1* E571K mutation in plasma cfDNA at the end of treatment, which could prove to be

statistically significant in a larger cohort. These results suggest that the clearance of the *XPO1* mutation in plasma cfDNA may represent a new prognostic marker for mutated patients. A study in a larger prospective cohort is warranted and already planned to draw definitive conclusions. In accordance with this observation, it has been reported that pretreatment levels of plasma Epstein Barr virus DNA (EBV-DNA), as determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (QRT-PCR), are associated with inferior outcomes among a large cohort of patients with previously untreated, advanced-stage Hodgkin lymphoma.[42] Another interesting potential biomarker is the combination of serum CD163 and tumor-specific TARC proteins that predicted disease response in a small cohort of 47 patients with HL.[43] These results still require validation and the usefulness of monitoring the MRD by *XPO1* somatic mutation detection in cfDNA, compared with other potential biomarkers, has to be assessed.

One of the limitations of our study, in addition to its retrospective nature with possible selection bias, is the absence of plasma available at time of diagnosis for 44 patients which potentially led to underestimating the prevalence of the mutation in these patients, for whom only biopsies were analyzed. The few discrepancies between the detection of the mutation in the plasma and the tumor can be explained partly by the poor quality of some of our biopsies with tumor cell scarcity, potentially rendering the mutation detection in biopsy-extracted DNA impossible, and secondly by the absence of tumor DNA release in plasma by certain tumors and the short half-life (10-15 minutes) of circulating DNA in plasma.[44] Another possibility of non-detection of this mutation in our cHL cases is the potential subclonality of the *XPO1* E571K mutation. This point warrants further research. In addition, it has been previously described that plasma cfDNA concentrations do not uniformly correlate with disease stage in solid tumors and biological mechanisms that underlined tumor cfDNA amount release are incompletely understood.[45,46] The results presented here are limited to patients with histologically confirmed cHL and may not be generalizable to HIV-associated HL, nodular lymphocyte-predominant HL or HL developing in the post-transplant setting. Finally, Selective Inhibitors of Nuclear Export (SINEs), have been shown to effectively target *XPO1* by retaining TSPs in the nucleus.[47] Given the frequency of *XPO1* E571 mutations in cHL, suggesting a crucial role of *XPO1* in cHL

pathophysiology, further investigation concerning their impact on response to SINEs is currently being investigated.[48]

To conclude, we identify herein a widely spread *XPO1* E571K mutation that is present in about one quarter of cHL patients. The presence of the *XPO1* E571K mutation in plasma cfDNA may serve as a novel biomarker in cHL. These data have to be confirmed in a large dedicated prospective study and it remains to be established whether this mutation adds new relevant value as compared to PET-scan and whether it can be targeted by SINE compounds for the treatment of cHL.

Acknowledgements

The authors would like to thank all the patients that provided samples for the study.

Authorship

Conflict of interest: The authors declare no competing financial interests.

References

1. Diehl V, Thomas RK, Re D. Part II: Hodgkin's lymphoma--diagnosis and treatment. Lancet Oncol. 2004;5(1):19–26.

2. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood. 2011;117(19):5019–32.

3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin. 2015;65(1):5–29.

4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. Lyon:IARC 2008.;

5. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. N Engl J Med. 1998;339(21):1506–14.

6. Hutchings M, Loft A, Hansen M, et al. FDG-PET after two cycles of chemotherapy predicts treatment failure and progression-free survival in Hodgkin lymphoma. Blood. 2006;107(1):52–9.

7. Canellos GP, Rosenberg SA, Friedberg JW, Lister TA, Devita VT. Treatment of Hodgkin lymphoma: a 50-year perspective. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2014;32(3):163–8.

8. Schmitz R, Stanelle J, Hansmann M-L, Küppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. Annu Rev Pathol. 2009;4:151–74.

9. Slovak ML, Bedell V, Hsu Y-H, et al. Molecular karyotypes of Hodgkin and Reed-Sternberg cells at disease onset reveal distinct copy number alterations in chemosensitive versus refractory Hodgkin lymphoma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2011;17(10):3443–54.

10. Schumacher MA, Schmitz R, Brune V, et al. Mutations in the genes coding for the NF- B regulating factors I B and A20 are uncommon in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma. Haematologica. 2010;95(1):153–7.

11. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. Blood. 2015;125(7):1061–72.

12. Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, et al. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2002;99(4):1474–7.

13. Joos S, Menz CK, Wrobel G, et al. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. Blood. 2002;99(4):1381–7.

14. Mareschal S, Dubois S, Viailly P-J, et al. Whole exome sequencing of relapsed/refractory patients expands the repertoire of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma. Genes Chromosomes Cancer. 2015;

15. Dubois S, Viailly PJ, Mareschal S, et al. Next Generation Sequencing in Diffuse Large B Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. In Press.

16. Steidl C, Gascoyne RD. The molecular pathogenesis of primary mediastinal large B-cell lymphoma. Blood. 2011;118(10):2659–69.

17. Ritz O, Guiter C, Castellano F, et al. Recurrent mutations of the STAT6 DNA binding domain in primary mediastinal B-cell lymphoma. Blood. 2009;114(6):1236–42.

18. Etchin J, Sanda T, Mansour MR, et al. KPT-330 inhibitor of CRM1 (XPO1)-mediated nuclear export has selective anti-leukaemic activity in preclinical models of T-cell acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2013;161(1):117–27.

19. Lapalombella R, Sun Q, Williams K, et al. Selective inhibitors of nuclear export show that CRM1/XPO1 is a target in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2012;120(23):4621–34.

20. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2014;32(6):579–86.

21. Bohers E, Viailly PJ, Dubois S, et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by Next Generation Sequencing reflect the genetic changes in both Germinal Center B-Cell like and Activated B-Cell like Diffuse Large B-Cell Lymphoma tumors at the time of diagnosis. Haematologica. 2015;

22. Vandenberghe P, Wlodarska I, Tousseyn T, et al. Non-invasive detection of genomic imbalances in Hodgkin/Reed-Sternberg cells in early and advanced stage Hodgkin's lymphoma by sequencing of circulating cell-free DNA: a technical proof-of-principle study. Lancet Haematol. 2015;2(2):e55–65.

23. Oki Y, Neelapu SS, Fanale M, et al. Detection of classical Hodgkin lymphoma specific sequence in peripheral blood using a next-generation sequencing approach. Br J Haematol. 2015;169(5):689–93.

24. Camus V, Sarafan-Vasseur N, Bohers E, et al. Digital PCR for quantification of recurrent and potentially actionable somatic mutations in circulating free DNA from patients with diffuse large B-cell lymphoma. Leuk Lymphoma. 2016;1–9.

25. Armbruster DA, Pry T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. Clin Biochem Rev. 2008;29(Suppl 1):S49–52.

26. Dubois S, Mareschal S, Picquenot J-M, et al. Immunohistochemical and genomic profiles of diffuse large B-cell lymphomas: Implications for targeted EZH2 inhibitor therapy? Oncotarget. 2015;

27. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2007;25(5):579–86.

28. Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Gaulard P, et al. Mediastinal gray zone lymphoma: the missing link between classic Hodgkin's lymphoma and mediastinal large B-cell lymphoma. Am J Surg Pathol. 2005;29(11):1411–21.

29. Lin D-C, Hao J-J, Nagata Y, et al. Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma. Nat Genet. 2014;46(5):467–73.

30. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. Leukemia. 2014;28(1):108–17.

31. Bond J, Bergon A, Durand A, et al. Cryptic XPO1-MLLT10 translocation is associated with HOXA locus deregulation in T-ALL. Blood. 2014;124(19):3023–5.

32. Guieze R, Robbe P, Clifford R, et al. Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. Blood. 2015;126(18):2110–7.

33. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. Nature. 2011;475(7354):101–5.

34. Chiu E, Gold T, Fettig V, LeVasseur MT, Cressman DE. Identification of a Nuclear Export Sequence in the MHC CIITA. J Immunol. 2015;194(12):6102–11.

35. Xie L, Ushmorov A, Leithauser F, et al. FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2012;119(15):3503–11.

36. Hao Y, Chapuy B, Monti S, et al. Selective JAK2 inhibition specifically decreases Hodgkin lymphoma and mediastinal large B-cell lymphoma growth in vitro and in vivo. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2014;20(10):2674–83.

37. Küppers R, Engert A, Hansmann M-L. Hodgkin lymphoma. J Clin Invest. 2012;122(10):3439–47.

38. Liu Y, Abdul Razak FR, Terpstra M, et al. The mutational landscape of Hodgkin lymphoma cell lines determined by whole-exome sequencing. Leukemia. 2014;28(11):2248–51.

39. Salipante SJ, Adey A, Thomas A, et al. Recurrent somatic loss of TNFRSF14 in classical Hodgkin lymphoma. Genes Chromosomes Cancer. 2015;

40. Weniger MA, Melzner I, Menz CK, et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. Oncogene. 2006;25(18):2679–84.

41. Ritz O, Rommel K, Dorsch K, et al. STAT6-mediated BCL6 repression in primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL). Oncotarget. 2013;4(7):1093–102.

42. Kanakry JA, Li H, Gellert LL, et al. Plasma Epstein-Barr virus DNA predicts outcome in advanced Hodgkin lymphoma: correlative analysis from a large North American cooperative group trial. Blood. 2013;121(18):3547–53.

43. Jones K, Vari F, Keane C, et al. Serum CD163 and TARC as disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2013;19(3):731–42.

44. Elshimali Y, Khaddour H, Sarkissyan M, Wu Y, Vadgama J. The Clinical Utilization of Circulating Cell Free DNA (CCFDNA) in Blood of Cancer Patients. Int J Mol Sci. 2013;14(9):18925–58.

45. Beau-Faller M, Gaub MP, Schneider A, et al. Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer patients. Int J Cancer J Int Cancer. 2003;105(3):361–70.

46. Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. Br J Cancer. 2015;113(3):476–83.

47. Lapalombella R, Sun Q, Williams K, et al. Selective inhibitors of nuclear export show that CRM1/XPO1 is a target in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2012;120(23):4621–34.

48. Jardin F. Recurrent Mutations of the Exportin 1 Gene (XPO1) in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma: a LYSA Study. 57th ASH, oral abstract #129. Blood:126 (23) ed. 2015;

Tables

Table 1 : Comparison of *XPO1* WT and MT clinical characteristics

Caracteristics	All patients	*XPO1* E571K MT	WT	p
number of patients	94	22 (24.2%)	69 (75.8%, NA=3)	
Men (n=)	53	14	38	0.6219
Women (n=)	41	8	31	
Age (years, median)	32	31	34	0.472
Age (SD)	14.3	11	15	
ECOG - 0-1	89	22	65	0.569
ECOG - 2-4	5	0	4	
1st line : 2-4 ABVD + RT	41	12	28	0.371
1st line : 6-8 ABVD	23	3	19	
1st line : BEACOPP based regimen (6 cycles)	27	7	19	
1st line : MOPP based regimen	3	0	3	
Mediastinum involvement	37	12	24	0.134
No mediastinum involvement	57	10	45	
Tumor size - Median (cm)	5	6	5	0.397
Tumor size - SD	3.72	3.52	3.86	
Histology - Mixed cellularity cHL	11	5	5	0.113
Histology - Nodular Sclerosis cHL	78	16	60	
Histology - Lymphocyte-rich cHL	1	0	1	
Histology - Unclassifiable	4	1	3	
Ann Arbor Stage 1-2	43	13	28	0.147
Ann Arbor stage 3-4	51	9	41	
Hasenclever - 0-2	20	4	16	1
IPS Hasenclever - 3-7	24	4	19	
IPS Hasenclever - NA	50	14	34	
Number of deaths	4	1	3	1
End of treatment evaluation - CR	69	18	48	0.748
End of treatment evaluation - RD	15	3	12	
End of treatment evaluation - NA	10	1	9	
Relapse	26	6	20	1
PET C2 NEGATIVE (n=)	44	10	32	0.197
PET C2 POSITIVE (n=)	16	7	9	
PET C2 - NA (n=)	34	5	28	

Abbreviations: SD: stable disease; CR: complete remission; RD: refractory disease; PET C2: positron emission tomography after 2 cycles of chemotherapy; NA: not available.

Legend to Figures :

Figure 1 : Plasmatic cfDNA *XPO1* E571K mutation VAF at diagnosis and after treatment completion (after 6-8 cycles of chemotherapy for advanced stage disease, or after 3-4 cycles of chemotherapy and radiotherapy for localized stage disease), with interim and end of treatment (EoT) PET-CT results. The interim PET at C2 is represented at the base of the arrow and end of treatment PET is represented at the tip of the arrow. The arrows show the variations of the *XPO1* mutation VAF in the plasma cfDNA between diagnosis and the end of treatment. The dotted line represents the detection limit (0.001).

Figure 2: OS and PFS according to the *XPO1* E571K cfDNA results at end of treatment (EoT). Negative: patients with undetectable *XPO1* mutation, Positive: patients with detectable *XPO1* E571K mutation in cfDNA at EoT.

Figure 3: Correlation between *XPO1* E571K VAF in biopsies and cfDNA

Figure 4: Monitoring *XPO1* mutations in biopsy and cfDNA of a refractory cHL patient (Patient N° 42) throughout her clinical history. The dotted line represents the detection limit (0.001).

Figures

Figure 1:

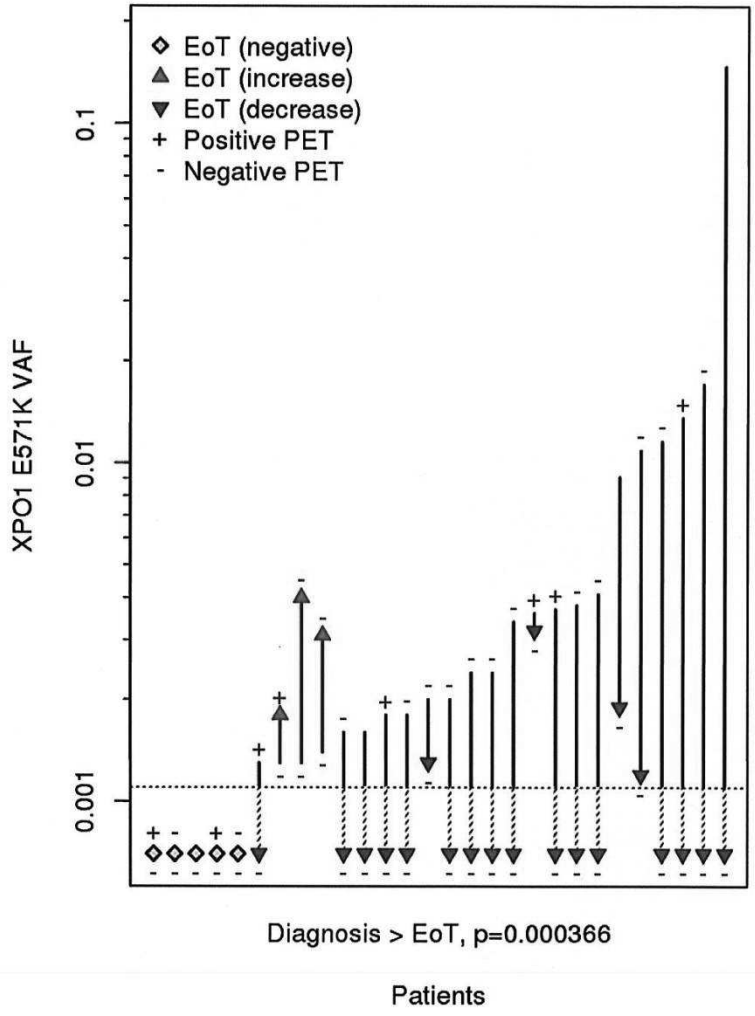


Figure 2:

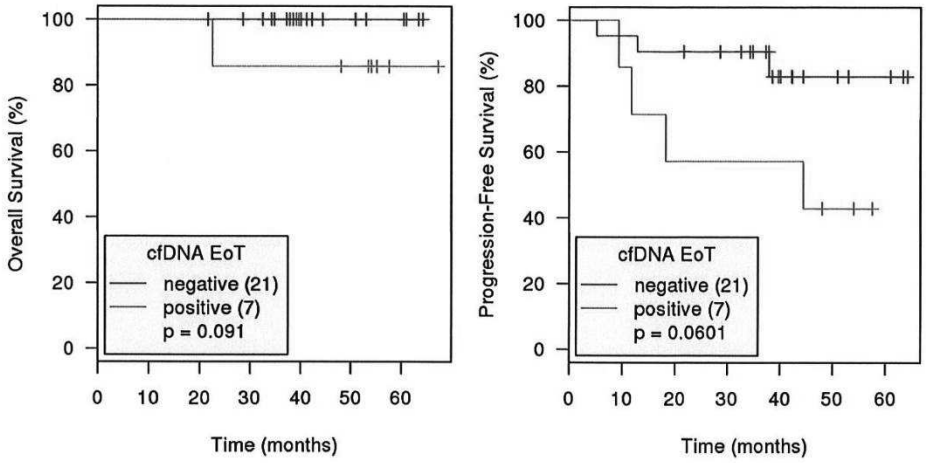

Overall Survival (%)
100
80
60
40
20
0
cfDNA EoT
negative (21)
positive (7)
p = 0.091
0 10 20 30 40 50 60
Time (months)
Progression-Free Survival (%)
100
80
60
40
20
0
cfDNA EoT
negative (21)
positive (7)
p = 0.0601
0 10 20 30 40 50 60
Time (months)

Figure 3:

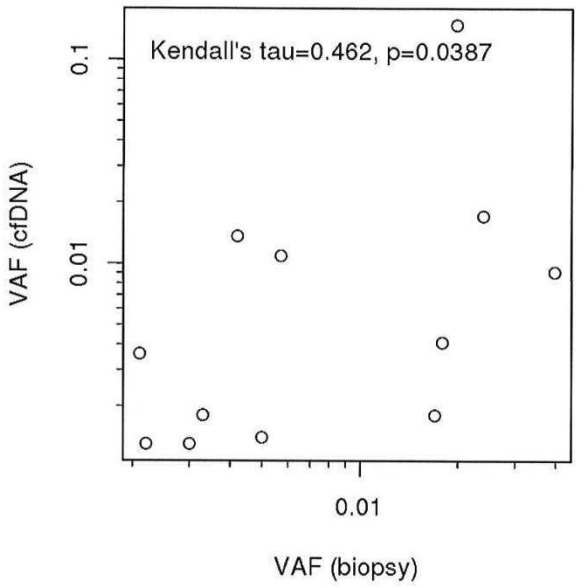
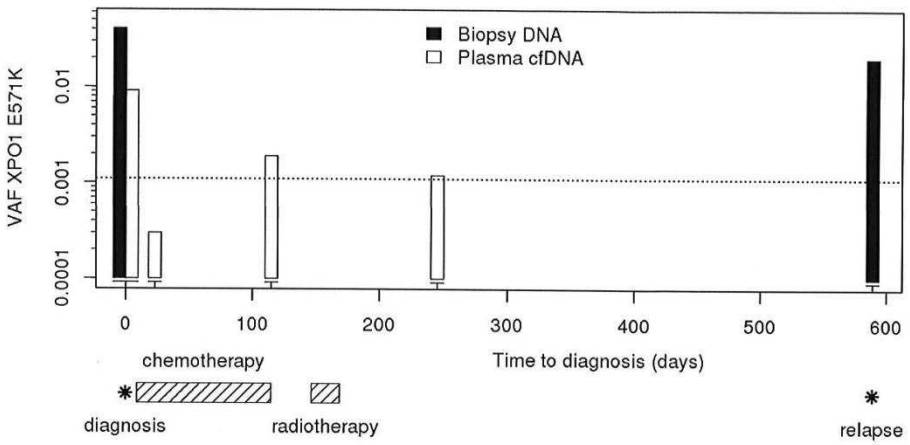


Figure 4:


Biopsy DNA
Plasma cfDNA
VAF XPO1 E571K
0.0001
0.001
0.01
0
100
200
300
400
500
600
Time to diagnosis (days)
chemotherapy
radiotherapy
diagnosis
relapse

BIBLIOGRAPHIE

1. Diehl V, Thomas RK, Re D. Part II: Hodgkin's lymphoma--diagnosis and treatment. Lancet Oncol. 2004 Jan;5(1):19–26.

2. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood. 2011 May 12;117(19):5019–32.

3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin. 2015 Feb;65(1):5–29.

4. Eichenauer DA, Engert A, André M, Federico M, Illidge T, Hutchings M, et al. Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO. 2014 Sep;25 Suppl 3:iii70–5.

5. Engert A, Younes A, editors. Hodgkin Lymphoma [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cited 2015 Dec 15]. (Hematologic Malignancies). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-12505-3

6. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. N Engl J Med. 1998 Nov 19;339(21):1506–14.

7. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1989 Nov;7(11):1630–6.

8. Duggan DB, Petroni GR, Johnson JL, Glick JH, Fisher RI, Connors JM, et al. Randomized comparison of ABVD and MOPP/ABV hybrid for the treatment of advanced Hodgkin's disease: report of an intergroup trial. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2003 Feb 15;21(4):607–14.

9. Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulus U, Hasenclever D, et al. Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced Hodgkin's disease. N Engl J Med. 2003 Jun 12;348(24):2386–95.

10. Meignan M, Barrington S, Itti E, Gallamini A, Haioun C, Polliack A. Report on the 4th International Workshop on Positron Emission Tomography in Lymphoma held in Menton, France, 3-5 October 2012. Leuk Lymphoma. 2014 Jan;55(1):31–7.

11. Hutchings M, Mikhaeel NG, Fields PA, Nunan T, Timothy AR. Prognostic value of interim FDG-PET after two or three cycles of chemotherapy in Hodgkin lymphoma. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO. 2005 Jul;16(7):1160–8.

12. Hutchings M, Loft A, Hansen M, Pedersen LM, Buhl T, Jurlander J, et al. FDG-PET after two cycles of chemotherapy predicts treatment failure and progression-free survival in Hodgkin lymphoma. Blood. 2006 Jan 1;107(1):52–9.

13. Evens AM, Hutchings M, Diehl V. Treatment of Hodgkin lymphoma: the past, present, and future. Nat Clin Pract Oncol. 2008 Sep;5(9):543–56.

14. Stathis A, Younes A. The new therapeutical scenario of Hodgkin lymphoma. Ann Oncol. 2015 Oct 1;26(10):2026–33.

15. Canellos GP, Rosenberg SA, Friedberg JW, Lister TA, Devita VT. Treatment of Hodgkin lymphoma: a 50-year perspective. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2014 Jan 20;32(3):163–8.

16. Cuccaro A, Bartolomei F, Cupelli E, Galli E, Giachelia M, Hohaus S. Prognostic factors in hodgkin lymphoma. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2014;6(1):e2014053.

17. Schmitz R, Stanelle J, Hansmann M-L, Küppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. Annu Rev Pathol. 2009;4:151–74.

18. Küppers R, Engert A, Hansmann M-L. Hodgkin lymphoma. J Clin Invest. 2012 Oct;122(10):3439–47.

19. Schumacher MA, Schmitz R, Brune V, Tiacci E, Doring C, Hansmann M-L, et al. Mutations in the genes coding for the NF- B regulating factors I B and A20 are uncommon in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma. Haematologica. 2010 Jan 1;95(1):153–7.

20. Slovak ML, Bedell V, Hsu Y-H, Estrine DB, Nowak NJ, Delioukina ML, et al. Molecular karyotypes of Hodgkin and Reed-Sternberg cells at disease onset reveal distinct copy number alterations in chemosensitive versus refractory Hodgkin lymphoma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2011 May 15;17(10):3443–54.

21. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, Giulino-Roth L, Tam W, Liu Y, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. Blood. 2015 Feb 12;125(7):1061–72.

22. Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Sonoki T, Tucker PW, Schlegelberger B, et al. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2002 Feb 15;99(4):1474–7.

23. Joos S, Menz CK, Wrobel G, Siebert R, Gesk S, Ohl S, et al. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. Blood. 2002 Feb 15;99(4):1381–7.

24. Dubois S, Viailly PJ, Mareschal S, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, et al. Next Generation Sequencing in Diffuse Large B Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. In Press.

25. Mareschal S, Dubois S, Viailly P-J, Bertrand P, Bohers E, Maingonnat C, et al. Whole exome sequencing of relapsed/refractory patients expands the repertoire of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma: Exome Sequencing of Refractory DLBCL. Genes Chromosomes Cancer. 2015 Nov;n/a – n/a.

26. Ritz O, Guiter C, Castellano F, Dorsch K, Melzner J, Jais J-P, et al. Recurrent mutations of the STAT6 DNA binding domain in primary mediastinal B-cell lymphoma. Blood. 2009 Aug 6;114(6):1236–42.

27. Steidl C, Gascoyne RD. The molecular pathogenesis of primary mediastinal large B-cell lymphoma. Blood. 2011 Sep 8;118(10):2659–69.

28. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. Cell. 1997 Sep 19;90(6):1051–60.

29. Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M, et al. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. Nature. 1997 Nov 20;390(6657):308–11.

30. Pemberton LF, Paschal BM. Mechanisms of Receptor-Mediated Nuclear Import and Nuclear Export. Traffic. 2005 Mar 1;6(3):187–98.

31. Nguyen KT, Holloway MP, Altura RA. The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. Int J Biochem Mol Biol. 2012 May 18;3(2):137–51.

32. Monecke T, Dickmanns A, Ficner R. Allosteric control of the exportin CRM1 unraveled by crystal structure analysis. FEBS J. 2014 Sep;281(18):4179–94.

33. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. Leukemia. 2014 Jan;28(1):108–17.

34. Lin D-C, Hao J-J, Nagata Y, Xu L, Shang L, Meng X, et al. Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma. Nat Genet. 2014 May;46(5):467–73.

35. Gunawardana J, Chan FC, Telenius A, Woolcock B, Kridel R, Tan KL, et al. Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. Nat Genet. 2014 Apr;46(4):329–35.

36. Etchin J, Sanda T, Mansour MR, Kentsis A, Montero J, Le BT, et al. KPT-330 inhibitor of CRM1 (XPO1)-mediated nuclear export has selective anti-leukaemic activity in preclinical models of T-cell acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2013 Apr;161(1):117–27.

37. Lapalombella R, Sun Q, Williams K, Tangeman L, Jha S, Zhong Y, et al. Selective inhibitors of nuclear export show that CRM1/XPO1 is a target in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2012 Nov 29;120(23):4621–34.

38. Kuruvilla J, Byrd JC, Flynn JM, et al. The Oral Selective Inhibitor of Nuclear Export (SINE) Selinexor (KPT-330) demonstrates Broad and Durable Clinical Activity in Relapsed / Refractory Non Hodgkin's Lymphoma (NHL) [Abstract 396]. 56th ASH Annual Meeting, San Francisco, CA; 2014 Dec 6;

39. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2014 Feb 20;32(6):579–86.

40. Bohers E, Viailly PJ, Dubois S, Bertrand P, Maingonnat C, Mareschal S, et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by Next Generation Sequencing reflect the genetic changes in both Germinal Center B-Cell like and Activated B-Cell like Diffuse Large B-Cell Lymphoma tumors at the time of diagnosis. Haematologica. 2015 Mar 6;

41. Vandenberghe P, Wlodarska I, Tousseyn T, Dehaspe L, Dierickx D, Verheecke M, et al. Non-invasive detection of genomic imbalances in Hodgkin/Reed-Sternberg cells in early and advanced stage Hodgkin's lymphoma by sequencing of circulating cell-free DNA: a technical proof-of-principle study. Lancet Haematol. 2015 février;2(2):e55–65.

42. Oki Y, Neelapu SS, Fanale M, Kwak LW, Fayad L, Rodriguez MA, et al. Detection of classical Hodgkin lymphoma specific sequence in peripheral blood using a next-generation sequencing approach. Br J Haematol. 2015 Jun;169(5):689–93.

43. Camus V, Vasseur N, Bohers E, Dubois S, Mareschal S, Bertrand P, et al. Digital PCR for quantification of recurrent and potentially actionable somatic mutations in circulating free DNA from patients with diffuse large B-cell lymphoma. Leuk Lymphoma. 2016;

44. Dubois S, Mareschal S, Picquenot J-M, Viailly P-J, Bohers E, Cornic M, et al. Immunohistochemical and genomic profiles of diffuse large B-cell lymphomas: Implications for targeted EZH2 inhibitor therapy? Oncotarget. 2015 Feb 5;

45. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2007 Feb 10;25(5):579–86.

46. Kanzler H, Hansmann ML, Kapp U, Wolf J, Diehl V, Rajewsky K, et al. Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. Blood. 1996 Apr 15;87(8):3429–36.

47. Schaadt M, Diehl V, Stein H, Fonatsch C, Kirchner HH. Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease. Int J Cancer J Int Cancer. 1980 Dec 15;26(6):723–31.

48. Diehl V, Pfreundschuh M, Fonatsch C, Stein H, Falk M, Burrichter H, et al. Phenotypic and genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications. Cancer Surv. 1985;4(2):399–419.

49. Hock BD, Hart DNJ. Cellular protein profiles of the Hodgkin's disease cell lines L428, KM-H2 and HDLM-2: A comparative study. Leuk Res. 1992 Mar;16(3):253–63.

50. Kapp U, Düx A, Schell-Frederick E, Banik N, Hummel M, Mücke S, et al. Disseminated growth of Hodgkin's-derived cell lines L540 and L540cy in immune-deficient SCID mice. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO. 1994;5 Suppl 1:121–6.

51. Möller P, Mader A, Barth TFE, Brüderlein S. [U-HO1. A new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma]. Pathol. 2008 Nov;29 Suppl 2:317–8.

52. Liu Y, Abdul Razak FR, Terpstra M, Chan FC, Saber A, Nijland M, et al. The mutational landscape of Hodgkin lymphoma cell lines determined by whole-exome sequencing. Leukemia. 2014 Nov;28(11):2248–51.

53. Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Gaulard P, Sorbara L, Alonso MA, Raffeld M, et al. Mediastinal gray zone lymphoma: the missing link between classic Hodgkin's lymphoma and mediastinal large B-cell lymphoma. Am J Surg Pathol. 2005 Nov;29(11):1411–21.

54. Bond J, Bergon A, Durand A, Tigaud I, Thomas X, Asnafi V, et al. Cryptic XPO1-MLLT10 translocation is associated with HOXA locus deregulation in T-ALL. Blood. 2014 Nov 6;124(19):3023–5.

55. Guieze R, Robbe P, Clifford R, de Guibert S, Pereira B, Timbs A, et al. Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. Blood. 2015 Oct 29;126(18):2110–7.

56. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. Nature. 2011 Jun 5;475(7354):101–5.

57. Mareschal S, Dubois S, Viailly P-J, Bertrand P, Bohers E, Maingonnat C, et al. Whole exome sequencing of relapsed/refractory patients expands the repertoire of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma. Genes Chromosomes Cancer. 2015 Nov 26;

58. Chiu E, Gold T, Fettig V, LeVasseur MT, Cressman DE. Identification of a Nuclear Export Sequence in the MHC CIITA. J Immunol. 2015 Jun 15;194(12):6102–11.

59. Xie L, Ushmorov A, Leithauser F, Guan H, Steidl C, Farbinger J, et al. FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2012 Apr 12;119(15):3503–11.

60. Hao Y, Chapuy B, Monti S, Sun HH, Rodig SJ, Shipp MA. Selective JAK2 inhibition specifically decreases Hodgkin lymphoma and mediastinal large B-cell lymphoma growth in vitro and in vivo. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2014 May 15;20(10):2674–83.

61. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. Lyon:IARC 2008.;

62. Xerri L, Parc P, Bouabdallah R, Camerlo J, Hassoun J. PCR-mismatch analysis of p53 gene mutation in Hodgkin's disease. J Pathol. 1995 Feb;175(2):189–94.

63. Chen WG, Chen YY, Kamel OW, Koo CH, Weiss LM. p53 mutations in Hodgkin's disease. Lab Investig J Tech Methods Pathol. 1996 Oct;75(4):519–27.

64. Maggio EM, Stekelenburg E, Van den Berg A, Poppema S. TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus. Int J Cancer. 2001 Oct 1;94(1):60–6.

65. Salipante SJ, Adey A, Thomas A, Lee C, Liu YJ, Kumar A, et al. Recurrent somatic loss of TNFRSF14 in classical Hodgkin lymphoma. Genes Chromosomes Cancer. 2015 Dec 9;

66. Weniger MA, Melzner I, Menz CK, Wegener S, Bucur AJ, Dorsch K, et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. Oncogene. 2006 Apr 27;25(18):2679–84.

67. Ritz O, Rommel K, Dorsch K, Kelsch E, Melzner J, Buck M, et al. STAT6-mediated BCL6 repression in primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL). Oncotarget. 2013 Jul;4(7):1093–102.

68. Schmitz R, Hansmann M-L, Bohle V, Martin-Subero JI, Hartmann S, Mechtersheimer G, et al. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. J Exp Med. 2009 May 11;206(5):981–9.

69. Liu X, Yu H, Yang W, Zhou X, Lu H, Shi D. Mutations of NFKBIA in biopsy specimens from Hodgkin lymphoma. Cancer Genet Cytogenet. 2010 Mar;197(2):152–7.

70. Emmerich F, Theurich S, Hummel M, Haeffker A, Vry MS, Döhner K, et al. Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. J Pathol. 2003 Nov;201(3):413–20.

71. Lennerz JK, Hoffmann K, Bubolz A-M, Lessel D, Welke C, Rüther N, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 gene mutation status as a prognostic biomarker in classical Hodgkin lymphoma. Oncotarget. 2015 Oct 6;6(30):29097–110.

72. Maggio EM, Van Den Berg A, de Jong D, Diepstra A, Poppema S. Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma. Am J Pathol. 2003 Jan;162(1):29–35.

73. Kanakry JA, Li H, Gellert LL, Lemas MV, Hsieh W, Hong F, et al. Plasma Epstein-Barr virus DNA predicts outcome in advanced Hodgkin lymphoma: correlative analysis from a large North American cooperative group trial. Blood. 2013 May 2;121(18):3547–53.

74. Jones K, Vari F, Keane C, Crooks P, Nourse JP, Seymour LA, et al. Serum CD163 and TARC as disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2013 Feb 1;19(3):731–42.

75. Elshimali Y, Khaddour H, Sarkissyan M, Wu Y, Vadgama J. The Clinical Utilization of Circulating Cell Free DNA (CCFDNA) in Blood of Cancer Patients. Int J Mol Sci. 2013 Sep 13;14(9):18925–58.

76. Beau-Faller M, Gaub MP, Schneider A, Ducrocq X, Massard G, Gasser B, et al. Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer patients. Int J Cancer J Int Cancer. 2003 Jun 20;105(3):361–70.

77. Xie G, Hou A, Li L, Gao Y, Cheng S. Quantification of plasma DNA as a screening tool for lung cancer. Chin Med J (Engl). 2004 Oct;117(10):1485–8.

78. Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, Kupis W, Rudzinski P, Langfort R, et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. Br J Cancer. 2015 Jul 28;113(3):476–83.

79. Jardin F. Recurrent Mutations of the Exportin 1 Gene (XPO1) in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma: a LYSA Study. 57th ASH, oral abstract #129. Blood:126 (23) ed. 2015;

80. Tubiana M, Henry-Amar M, Carde P, Burgers JM, Hayat M, Van der Schueren E, et al. Toward comprehensive management tailored to prognostic factors of patients with clinical stages I and II in Hodgkin's disease. The EORTC Lymphoma Group controlled clinical trials: 1964-1987. Blood. 1989 Jan;73(1):47–56.

RESUME

Le lymphome de Hodgkin classique (LHc) est un des lymphomes les plus fréquents et partage de nombreuses caractéristiques cliniques et génétiques avec le lymphome B diffus à grandes cellules primitif du médiastin (PMBL). Dans la présente étude rétrospective, nous avons analysé une mutation récurrente de type *hotspot* du gène de l'exportin 1 (*XPO1*, p.E571K), précédemment identifiée dans les PMBL, dans une large série de biopsies et plasmas de patients diagnostiqués avec un LHc en première ligne de traitement, en utilisant une technique hautement sensible de PCR digitale (PCRd). 94 patients ont ainsi été inclus dans cette étude. La mutation *XPO1* E571K est retrouvée à une fréquence élevée, dans environ un quart des patients de notre étude (24,2%). Les patients mutés et non-mutés présentaient des caractéristiques cliniques similaires. Les patients avec une mutation restant détectable dans le plasma en fin de traitement avaient tendance à rechuter davantage que les patients dont la mutation était devenue indétectable dans le plasma en fin de traitement (PFS à deux ans = 57,1%, $IC_{95\%}$: 30,1%-100% versus PFS à 2 ans =90,5%, $IC_{95\%}$: 78,8%-100% respectivement, p=0,0601). En conclusion, la détection de la mutation *XPO1* E571K dans l'ADN extrait de la biopsie et du plasma par PCRd pourrait servir de nouveau biomarqueur dans le LHc, au moment du diagnostic et au cours du suivi de la maladie résiduelle. La détection de cette mutation dans le plasma des patients représente un saut technologique majeur dans la prise en charge du LHc.

MOTS-CLES : Lymphome de Hodgkin, exportin-1 (XPO1), PCR digitale, ADN plasmatique