



**HAL**  
open science

# Détermination moléculaire des sous-types de lymphomes B diffus à grandes cellules par un classifieur de type retrotranscription multiplex ligation-dependent probe amplification

Victor Bobée

► **To cite this version:**

Victor Bobée. Détermination moléculaire des sous-types de lymphomes B diffus à grandes cellules par un classifieur de type retrotranscription multiplex ligation-dependent probe amplification. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01655035

**HAL Id: dumas-01655035**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01655035>**

Submitted on 4 Dec 2017

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

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

**UNIVERSITÉ DE ROUEN**  
**UFR DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE**

Année 2017

N°

**THÈSE**

**Pour le DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE  
BIOLOGIE MÉDICALE**

Présentée et soutenue publiquement le 25 septembre 2017

Par

*BOBÉE Victor*

Né le 8 juillet 1989 à Mont-Saint-Aignan

**Détermination moléculaire des sous-types de  
lymphomes B diffus à grandes cellules par un  
classifieur de type *retrotranscription multiplex  
ligation-dependent probe amplification***

Président du jury : Pr Isabelle DUBUS, PU

Membres du jury : Pr Fabrice JARDIN, PU-PH

Dr Gérard BUCHONNET, MCU-PH

Dr Yannick LE BRIS, PH

Dr Philippe RUMINY



## **REMERCIEMENTS**

J'adresse mes plus sincères remerciements aux membres du jury. Merci de consacrer un peu de votre temps à la relecture de ce travail, fruit d'une année de Master 2 dans l'unité 918.

Je remercie infiniment le Dr Philippe Ruminy, roi incontesté de la MLPA, qui a dirigé cette thèse. J'ai eu l'énorme chance de partager ton bureau pendant près d'un an. Cela a été un grand avantage pour l'avancée de mon projet et m'a permis de progresser rapidement sur la biologie des lymphomes. Je te remercie pour ta disponibilité exemplaire au quotidien, ta bonne humeur, ta générosité et tes conseils précieux. Nous avons beaucoup conversé sur des sujets dépassant de loin l'hématologie. Citons ici Kaamelott, Francis blaireau farceur et les débats sur l'assurance-qualité des laboratoires. Je suis d'ailleurs persuadé que tu deviendras bientôt un qualicien hors pair.

Merci mille fois au directeur de l'unité, le Pr Fabrice Jardin, de m'avoir permis d'intégrer son équipe de recherche. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité au quotidien. Merci pour tes encouragements et ton enthousiasme à chaque fois que je t'ai montré l'avancée de mes travaux et lorsque je t'ai parlé de mon envie de continuer l'aventure dans l'unité.

Je remercie le Pr Isabelle Dubus qui me fait l'honneur de présider ce jury et de co-diriger ce travail. C'est vous que je connais depuis le plus longtemps dans ce jury puisque vous m'avez connu dès le premier cycle universitaire. Merci pour votre disponibilité et votre implication pour les étudiants en pharmacie en général. Je me souviens notamment d'un lancer de projectile sur un étudiant qui n'écoutait pas lors d'un cours de biochimie. Cela restera pour moi un exemple de pédagogie alternative intéressant dont je ne manquerai pas de me rappeler si besoin.

Je remercie le Dr Gérard Buchonnet pour sa gentillesse et sa pédagogie. Merci de me transmettre quotidiennement une partie de tes connaissances. Ta rigueur et ton esprit de synthèse sont pour moi exemplaires. Merci de me traiter comme un collègue depuis plusieurs semestres, alors que je resterai éternellement ton élève. Merci d'avoir suggéré mon nom pour participer aux enseignements de pharmacie en hématologie. Merci pour ton écoute et tes conseils.

Je remercie le Dr Yannick Le Bris d'avoir accepté de faire le voyage depuis Nantes pour juger ce travail. Je le remercie de son intérêt pour ce sujet et lui témoigne toute ma reconnaissance.

Merci aux membres de l'unité 1245, anciennement 918, pour leur accueil et leur bienveillance. Ce travail est avant tout le leur :

Je remercie Vivianne, l'assistante du Dr Ruminy, de m'avoir accueilli le premier jour et les suivants, et d'avoir préparé notre café tous les jours. Merci de m'avoir habilité aux techniques du laboratoire, d'avoir passé du temps à me montrer comment manipuler et d'avoir cherché des solutions à mes problèmes (professionnels bien sûr). Je pense que tous les stagiaires qui passent dans l'unité te sont reconnaissants de ta gentillesse et de ta franchise. Je te remercie d'avoir été une relectrice assidue et exigeante de mon mémoire de M2 et de mes présentations. Je n'ai toujours pas compris pourquoi tu t'obstinais parfois à jeter des projectiles vers mon bureau (thème récurrent de ces remerciements malgré moi).

Je remercie le Dr Elodie Bohers, troisième collègue du bureau du 3<sup>ème</sup> étage. Merci pour ta gentillesse et ton sourire. Merci d'avoir consacré du temps à m'initier au séquençage Sanger et au Qubit (qui sonne mieux à l'oral qu'à l'écrit). Merci pour tes encouragements. Nous avons pu débriefer les épisodes de la saison 6 de Game of Thrones chaque mardi matin. Malheureusement je n'étais pas présent pour la saison 7. Je te souhaite plein de bonheur avec Charlotte.

Je remercie Pierre-Julien Viailly, le bioinformaticien qui carbure au tic-tac, pour tout le temps qu'il a passé sur ce projet. Merci d'avoir réussi à réaliser le *clustering* et les modèles du premier coup sans aucune erreur, ce qui est assez incroyable et nous a permis de gagner un temps fou. La multiplicité de tes cafés dans le bureau du 3<sup>ème</sup> étage a été une véritable aubaine pour moi puisque c'est souvent à cette occasion que j'ai pu te montrer mes résultats et profiter de tes remarques et conseils. N'oublie pas que je ne serai pas toujours derrière toi pour corriger tes codes. Merci pour tout, je te souhaite beaucoup de réussite.

Merci au Dr Philippe Bertrand et à Catherine Maingonnat pour leur gentillesse et leur sourire.

Merci au Dr Sydney Dubois pour sa bonne humeur et son sourire constant. Ton parcours exemplaire dans le monde de la recherche fait envie, je te souhaite le meilleur pour ta carrière médicale.

Merci au Dr Sylvain Mareschal pour l'héritage qu'il a laissé. Je t'ai connu seulement quelques semaines, tu es parti trop tôt. Compter des pingouins sur une île. Pourquoi pas après tout.

Merci au Dr Vincent Camus qui m'a précédé en tant que stagiaire en Master 2 dans l'unité et que j'avais déjà brièvement côtoyé à l'IBC. Tu es une source d'inspiration de par tes travaux déjà nombreux et je te souhaite d'obtenir le poste qui te plaira, qu'il soit universitaire ou non.

Merci à Crapotin. Le jour s'est levé et toi aussi. Surveille tout de même l'échelle de Denver, elle pourrait te tomber dessus sans prévenir.

Merci à tous les techniciens du laboratoire de biologie moléculaire du Centre Henri Becquerel qui ont tous été adorables et m'ont aidé tandis que je manipulais dans leurs locaux. Matthieu reste tout de même à surveiller de près. Je le pense capable de partir en vrille rapidement.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire d'anatomo-pathologie et notamment le Dr Jean-Michel Picquenot et Marie Cornic qui ont passé du temps à faire avancer nos travaux, ainsi qu'au Dr Fanny Drieux à qui je souhaite du courage pour les lymphomes T.

Merci à tous les biologistes qui m'ont formé pendant ces 5 années d'internat. En particulier ceux du laboratoire d'Hématologie :

Je remercie le Dr Bernard Lenormand, chef de service du laboratoire d'Hématologie, pour sa bienveillance envers moi qui a commencé pendant mon premier stage et qui n'a pas cessé depuis. Merci pour votre gentillesse et votre soutien. Merci de vous préoccuper de l'avenir de vos internes et de tous vos efforts pour satisfaire leur souhait de post-internat. Merci de m'avoir rapidement proposé des responsabilités.

Je remercie le Dr Sylvie Daliphard pour sa connaissance infinie de l'hématologie biologique et son engagement passionné au quotidien. Merci pour ta spontanéité et tes bavardages, qui permettent aux générations d'internes d'apprendre à réagir face aux anomalies et problèmes fréquemment rencontrés au laboratoire. Merci pour tes relectures toujours rigoureuses. Merci pour ton inépuisable envie d'améliorer les choses et de ne pas rester figé dans les habitudes. Nous avons souvent refait le monde de la biologie (et parfois au-delà) lors des longues heures devant le microscope. Tu resteras également ma référence des expressions de la langue française, connues et inconnues.

Je remercie le Dr Agnès Lahary de son enthousiasme contagieux à partager ses connaissances sur les pathologies érythrocytaires. Merci de venir me montrer les cas intéressants qui se présentent à toi. Ton sens clinique et ta vivacité d'esprit font de toi un hématologiste hors pair. Bravo pour ton énergie quotidienne (certains internes t'ont d'ailleurs surnommé Speedy Gonzales). Une partie de l'âme du service partira avec toi.

Je remercie le Dr Catherine Boutet pour son extrême gentillesse et sa pédagogie. Merci de m'avoir instantanément fait apprécier l'analyse des immunophénotypages. Tout semble facile avec tes explications.

Je remercie les Dr Marie-Hélène Chrétien, Marielle Fresel et Virginie Barbay pour leur disponibilité et leur patience lors de la revue des dossiers d'hémostase. J'ai beaucoup appris grâce à vous. Marie-Hélène, je ne désespère pas de venir un jour assister au festival de musique que tu organises annuellement.

Je remercie l'ensemble des techniciens du laboratoire d'Hématologie pour leur accueil quand je suis arrivé et pour leur gentillesse depuis. En particulier, je remercie Dany pour son implication et ma formation initiale aux gardes, Florence pour la formation initiale côté hémostase et biologie moléculaire, Jessie pour son humeur pétillante qui fait du bien à toute l'équipe, ainsi que Brigitte, Cécile, Céline et Edwige, les techniciennes du secteur des globules rouges pour leur aide et leur implication.

Je remercie le reste du personnel du laboratoire d'Hématologie, en particulier le Dr Véronique Le Cam, le Dr Pierre Chamouni pour son sourire (et son bureau), nos 4 secrétaires Gervaise, Angélique, Valérie et Martine qui ont toujours un mot gentil et les infirmières qui ont quelquefois rattrapé mes échecs de prélèvement sanguin.

Je remercie l'ensemble des biologistes et techniciens qui m'ont formé dans les autres stages lors de mon niveau 1 : je remercie les Dr Jérémie Martinet, Fabienne Jouen et Serge Jacquot en immunologie pour m'avoir fait me sentir comme un praticien en formation pour la première fois. Je remercie les Dr Guy Hue et Bruno Cauliez, anciens biochimistes, de leur gentillesse. Je remercie le Dr Murielle Quillard pour ses explications exhaustives et ses impressionnantes connaissances en biochimie. Je remercie le Dr Noëlle Frebourg pour son calme et sa rigueur, ainsi que le Dr Ludovic Lemée pour son accueil et sa pédagogie.

Merci aux autres personnes ayant influencé positivement mon parcours :

Je remercie le Pr Olivier Boyer pour son soutien, notamment lors de ma demande d'année recherche.

Je remercie le Pr Loïc Favennec à la fois comme enseignant de la faculté de pharmacie et comme coordonnateur des internes de biologie. Vos cours étaient un réel plaisir et m'ont toujours passionné. En fait, j'ai toujours préféré lorsque vous aviez oublié vos notes et que vous faisiez tout le cours de tête. Heureusement pour moi, c'était fréquent. Merci pour votre disponibilité et vos conseils lorsque je suis venu vous voir une fois que j'avais passé le concours de l'internat. Pour rappel, je vous avais demandé s'il y avait des villes à privilégier ou à éviter pour effectuer mon D.E.S., vous m'avez répondu "Ca dépend! Si vous voulez faire du ski faut aller à Lyon! Si vous voulez faire de la voile faut aller dans l'Ouest!". Cela restera une déception de ne pas avoir eu l'occasion de faire un stage dans votre service.

Je remercie le Pr Soumeya Bekri pour avoir soutenu la réforme des gardes des internes de biologie, pour nous avoir demandé notre avis dès le début et avoir défendu notre vision.

Je remercie le Pr Martine Pestel-Caron pour son écoute et sa rigueur lors de nos entretiens concernant les internes et les étudiants en pharmacie.

Je remercie mes enseignants de la faculté de pharmacie. Tout particulièrement, je remercie le Pr Marc Vasse de m'avoir insufflé la passion de l'hématologie lors de ses cours. Je remercie le Pr Jean Costentin pour ses talents oratoires qui ont réussi l'exploit de me faire venir en cours à 8h par tous les temps, pour ses contrepèteries incomprises et sa haine des

drogues (mais pas des drogués qui ne sont pas des sales types mais des pauvres types). Je remercie le Pr Michel Guerbet qui avait souvent la lourde tâche d'avoir cours le vendredi matin pour son soutien constant des initiatives étudiantes. Enfin, j'adresse mes remerciements posthumes au Pr Jean-Louis Pons pour m'avoir encouragé dès la 2<sup>ème</sup> année à suivre la filière biologie. Merci d'avoir accru ma motivation à passer le concours d'internat en m'invitant à venir visiter le service de bactériologie et en me faisant rencontrer des internes du service.

Je remercie l'ensemble des internes et anciens internes que j'ai côtoyé à l'exception de deux d'entre eux. En particulier, merci aux Dr Elsa Bera et Jovani Abboud auprès desquels j'ai appris. Je remercie le bureau 2015 de l'AIPBR, Association des internes en pharmacie et biologie de Rouen, que je suis fier d'avoir présidé, chose que je n'aurais jamais cru envisageable quelques années auparavant. Je remercie également le personnel de garde qui m'a accompagné et soutenu lors des longues nuits au laboratoire : Yoann Chemin bien sûr, mais aussi les courageux étudiants en pharmacie notamment Jean-Eudes, Fabrice, Benjamin, Maxime, Karim, Milan et Fifou.

Je remercie Aurélien Schrapp pour ses nombreuses qualités. Tu as cette capacité à devenir instantanément ami avec absolument tout le monde, même moi.

Je remercie le Dr Henri Gondé, le lâcheur de Louise, pour ses 28 remarques sur le manuscrit qui pourrait donc s'intituler « 28 remarques plus tard ».

Je remercie le Dr Simon Lanne pour sa rigueur et ses relectures attentives de mes travaux. Je suis heureux de t'avoir convaincu de prendre en charge les conférences de préparation à l'internat pendant un an. Les étudiants dont tu t'es occupé t'en sont reconnaissants. Je remercie Mathilde et Arthur pour leur sourire.

Je remercie Kévin Cassinari pour toutes les connaissances qu'il m'a fait partager sur le système hospitalo-universitaire. Tu as été un capitaine exemplaire de l'AIPBR. Je te suis reconnaissant de tout ce que tu fais depuis des années pour défendre les internes, hormis cette histoire d'interdiction des gardes techniques, comme tu le sais.

Je remercie le Dr Cédric Paquin pour tout. Nous sommes liés à jamais par nos années passées sur les bancs de la faculté et d'ailleurs.

Je remercie le Dr Frédéric Honoré pour son humour décapant et sa générosité. Je remercie Mélodie de t'avoir dompté et de t'empêcher de devenir un criminel. Je sais très bien qu'au départ tu faisais des affaires règlementaires pour apprendre à contourner la loi et te la jouer *breaking bad*.

Je remercie le Dr Rémi Legrand pour son mojo. Merci de m'avoir appris à faire du ski.

Je remercie le Dr Maxime Duclos de son enthousiasme à toute épreuve et pour son hélicoptère.

Je remercie les Dr Charles Beck, Damien Fuss, Xavier Oudinot, ainsi que le futur Dr Thibault Cousin de leur amitié. Je remercie les Dr Cécile Blaisot et Emilie Casel pour les travaux pratiques.

Je remercie Samuel pour les années colocation, Florent et Hélène pour leurs encouragements, Morgan et Mathilde pour leur amitié, je salue leur fils Louis au passage.

Je remercie Lisa, Lucas, Jérémie, Justin, Alexandre et Fabrice et les autres personnes qui vont sauver le monde. Je remercie Pierre et Pauline, Emeline et Maxime de leur gentillesse.

Je remercie Linsay pour son soutien sans faille et pour me faire voir la vie du bon côté lorsque je râle. Je me suis abonné à beIN Sports pour toi.

Je remercie mes parents de m'avoir mis au monde, nourri, logé, habillé et éduqué jusqu'à mon indépendance (en même temps la loi vous y obligeait).

Enfin, je remercie celle sans qui pas grand-chose ne serait possible. Celle qui boit pourtant des litres et des litres et que les gens connaissent sous le nom de *joy machine*. Merci à mon célèbre Honda HR-V qui m'a porté aux 4 coins de la France.

Bonne lecture.



**« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »**



ANNEE UNIVERSITAIRE 2016 - 2017

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

-----  
DOYEN : Professeur Pierre FREGER  
ASSESEURS : 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 Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE (détachement)	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW (surnombre)	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
Mr Stéphanie DERREY	HCN	Neurochirurgie
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	Hépto-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
Mr Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
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 - Vénérologie

Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
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
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
Mr 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	Hépatogastro-entérologie
Mr Benoit MISSET	HCN	Réanimation Médicale
Mr Jean-François MUIR (surnombre)	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe MUsETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Me Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
Mr Jean-Christophe RICHARD (détachement)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
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 (surnombre)	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
Mr Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER (surnombre)	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	HB	Service Santé 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
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
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 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	Virologie
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie

### PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ

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 (Professeur émérite)	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 CONFÉRENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémie BELLIEU (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOU	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER	Statistiques
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
Mme Dominique DUTERTE-BOUCHER	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 Marine MALLETER	Biologie Cellulaire
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

### PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCC	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

### PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
---------------------	---------

### ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mme Sandrine DAHYOT	Bactériologie
---------------------	---------------

### ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Hanane GASMI	Galénique
Mme Benedetta CORNELIO	Chimie organique

<b>LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES</b>
---

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
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 Rémi VARIN	Pharmacie clinique
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

### III – MEDECINE GENERALE

#### PROFESSEUR

Mr Jean-Loup HERMIL UFR Médecine générale

#### PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel LEFEBVRE UFR Médecine Générale  
Mme Elisabeth MAUVIARD UFR Médecine générale  
Mr Philippe NGUYEN THANH UFR Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal BOULET UFR Médecine générale  
Mr Emmanuel HAZARD UFR Médecine Générale  
Mme Lucile 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) Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)  
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med) Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)  
Mme Carine CLEREN (med) Neurosciences (Néovasc)  
Mr Sylvain FRAINEAU (phar) Physiologie (Inserm U 1096)  
Mme Pascaline GAILDRAT (med) Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)  
Mr Nicolas GUEROUT (med) Chirurgie Expérimentale  
Mme Rachel LETELLIER (med) Physiologie  
Mme Christine RONDANINO (med) Physiologie de la reproduction  
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med) Physiologie (Unité Inserm 1076)  
Mr Frédéric PASQUET Sciences du langage, orthophonie  
Mme Isabelle TOURNIER (med) Biochimie (UMR 1079)

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

HCN - Hôpital Charles Nicolle  
CB - Centre Henri Becquerel  
CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME  
CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray  
SJ – Saint Julien Rouen



## TABLE DES MATIERES

<b>1</b>	<b>LES LYMPHOMES B DIFFUS A GRANDES CELLULES.....</b>	<b>25</b>
1.1	HISTORIQUE DE LA CLASSIFICATION DES LYMPHOMES .....	25
1.1.1	<i>XIX<sup>ème</sup> siècle : première description des lymphomes.....</i>	<i>25</i>
1.1.2	<i>Fin du XIX<sup>ème</sup> siècle: première vision cellulaire.....</i>	<i>25</i>
1.1.3	<i>Début du XXème siècle : .....</i>	<i>26</i>
1.1.4	<i>1950-1960 : la rupture conceptuelle de Rappaport .....</i>	<i>26</i>
1.1.5	<i>1960-1980 : La révolution immunobiologique.....</i>	<i>27</i>
1.1.6	<i>REAL classification de 1994 : l'oncogenèse par translocation chromosomique.....</i>	<i>30</i>
1.1.7	<i>Classifications OMS 2001 et 2008 : puces à ADN et biologie moléculaire .....</i>	<i>30</i>
1.1.8	<i>Mise à jour 2016 de la classification OMS : le NGS au service des thérapies ciblées ..</i>	<i>32</i>
1.2	CLASSIFICATION ACTUELLE DES LBDGC.....	32
1.2.1	<i>LBDGC, NOS .....</i>	<i>32</i>
1.2.2	<i>LBDGC EBV+.....</i>	<i>35</i>
1.2.3	<i>LBDGC riches en lymphocytes T et en histiocytes .....</i>	<i>36</i>
1.2.4	<i>LBDGC cutanés primitifs de la jambe (leg-type).....</i>	<i>36</i>
1.2.5	<i>LBDGC primitifs du système nerveux central .....</i>	<i>36</i>
1.2.6	<i>Lymphomes apparentés aux LBDGC .....</i>	<i>37</i>
1.3	DIAGNOSTIC .....	38
1.3.1	<i>Présentation clinique.....</i>	<i>38</i>
1.3.2	<i>Diagnostic biologique .....</i>	<i>38</i>
1.3.3	<i>Evaluation initiale du patient.....</i>	<i>39</i>
1.4	TRAITEMENT STANDARD .....	40
1.5	EVALUATION DE LA REPONSE AU TRAITEMENT.....	42
1.5.1	<i>TEP/TDM .....</i>	<i>42</i>
1.5.2	<i>Maladie résiduelle.....</i>	<i>43</i>
1.6	NOUVEAUX TRAITEMENTS : THERAPIES CIBLEES .....	44
1.6.1	<i>Sous-type ABC.....</i>	<i>44</i>
1.6.2	<i>Sous-type GCB .....</i>	<i>45</i>
1.6.3	<i>PMBL .....</i>	<i>45</i>

<b>2</b>	<b>INTRODUCTION A L'ARTICLE .....</b>	<b>46</b>
2.1	HISTOIRE DES CLASSIFICATIONS MOLECULAIRES DES LBDGC .....	46
2.1.1	<i>Découverte des sous-types GCB et ABC .....</i>	46
2.1.2	<i>Mise au point d'un prédicteur bayésien .....</i>	48
2.1.3	<i>Diagnostic moléculaire des PMBL .....</i>	49
2.2	TESTS DISPONIBLES POUR LA CLASSIFICATION MOLECULAIRE DES LBDGC .....	51
2.2.1	<i>Puces à ADN Affymetrix.....</i>	51
2.2.2	<i>Algorithmes d'immunohistochimie .....</i>	52
2.2.3	<i>Nanostring nCounter Technologies .....</i>	54
2.2.4	<i>Test quantitatif de protection contre une nuclease.....</i>	56
2.3	CLASSIFICATION GCB/ABC PAR UN TEST DE TYPE RT-MLPA.....	57
2.3.1	<i>Principe de la MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) .....</i>	57
2.3.2	<i>Applications de la MLPA .....</i>	58
2.3.3	<i>Test développé au Centre Henri Becquerel.....</i>	60
2.4	OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	61
<b>3</b>	<b>ARTICLE EN ANGLAIS .....</b>	<b>62</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>63</b>
	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>64</b>
	<b>MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>65</b>
	<b>RESULTS .....</b>	<b>70</b>
	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>81</b>
	<b>REFERENCES.....</b>	<b>84</b>
	<b>SUPPLEMENTAL FILES.....</b>	<b>87</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>99</b>
<b>5</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>ANNEXES.....</b>	<b>112</b>
6.1	CLASSIFICATION DES HEMOPATHIES LYMPHOÏDES DE LA REVISION 2016 DE L'OMS <sup>20</sup> .....	112
6.2	MODE OPERATOIRE DU TEST RT-MLPA .....	113
6.3	COMMUNICATION AFFICHEE AU CONGRES DE LA SFH 2017 .....	114
	<b>SERMENT DE GALIEN.....</b>	<b>117</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 Tumeurs ganglionnaires du début du XX <sup>ème</sup> siècle .....	26
Tableau 2 Classification des lymphomes non-Hodgkiniens selon Rappaport.....	27
Tableau 3 Classifications des lymphomes malins non-Hodgkiniens utilisées dans les années 80.....	29
Tableau 4 Classification d'Ann-Arbor .....	39
Tableau 5 Score de gravité ECOG .....	40
Tableau 6 Calcul du score IPI et groupe pronostique.....	40

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 Classification des syndromes lymphoprolifératifs selon leur cellule d'origine .....	31
Figure 2 Prédiction du sous-type par GEP et courbes de survie globale en fonction du sous-type.....	33
Figure 3 Représentation de la voie du BCR et de la voie NF- $\kappa$ B .....	35
Figure 4 Aspect microscopique d'un LBDGC et d'un sous-type riche en lymphocytes T et en histiocytes..	36
Figure 5 Transformation d'une leucémie lymphoïde chronique en LBDGC.....	39
Figure 6 Traitements de première ligne des LBDGC.....	41
Figure 7 Images de TEP-TDM.....	42
Figure 8 Suivi de la fréquence allélique de la mutation MYD88 L265P dans l'ADN circulant.....	43
Figure 9 Découverte des sous-types de LBDGC par profil d'expression génique .....	47
Figure 10 Confirmation des sous-types moléculaires sur une cohorte de 274 patients, analyse de survie .	47
Figure 11 Prédiction du sous-type par GEP et courbes de survie globale en fonction du sous-type.....	49
Figure 12 Mise en évidence d'une signature moléculaire de PMBL .....	50
Figure 13 Principe des puces à ADN de type Affymetrix .....	51
Figure 14 Algorithme de Hans utilisé en immunohistochimie .....	53
Figure 15 Principe de la technologie Nanostring nCounter.....	54
Figure 16 Test Lymph2Cx, nCounter Nanostring : résultats de la cohorte de validation .....	55
Figure 17 Principe du qNPA (test de protection contre une nucléase).....	56
Figure 18 Composition des sondes utilisées en MLPA .....	57
Figure 19 Profil d'expression génique par RT-MLPA .....	59
Figure 20 Recherche de SNV par MLPA .....	59
Figure 21 Profils d'expression génique obtenus par RT-MLPA.....	60

## LISTE DES TABLEAUX DE L'ARTICLE

Table 1 Sequences of RT-MLPA probes and competitors .....	69
Table 2 Comparison of RT-MLPA and Affymetrix GEP results .....	79
Table 3 Comparison of Immunocytochemistry and Affymetrix GEP results .....	80
Supplemental Table 1 List of discriminating genes used for unsupervised hierarchical clustering .....	98

## LISTE DES FIGURES DE L'ARTICLE

Figure 1 Representative RT-MLPA profiles .....	70
Figure 2 Molecular classification of the GHEDI series determined by unsupervised hierarchical clustering .....	72
Figure 3 Principal component analysis of the RT-MLPA results .....	73
Figure 4 Principle of the RT-MLPA PMBL/ABC/GCB prediction .....	74
Figure 5 RT-MLPA PMBL predictor training and validation .....	75
Figure 6 Differential expression of PMBL discriminant genes .....	76
Figure 7 RT-MLPA GCB/ABC predictor training and validation .....	77
Figure 8 Differential expression of GCB/ABC marker genes .....	78
Figure 9 Additional RT-MLPA profiles .....	81
Supplemental Figure S1 Detection of <i>MYD88</i> L265P mutation by RT-MLPA .....	87
Supplemental Figure S2 AFA fixed RT-MLPA profiles .....	88
Supplemental Figure S3 AFA fixed RT-MLPA profiles .....	89
Supplemental Figure S4 AFA fixed RT-MLPA profiles .....	90
Supplemental Figure S5 AFA and Bouin fixed RT-MLPA profiles .....	91
Supplemental Figure S6 <i>MYD88</i> L265P ABC DLBCL RT-MLPA profiles .....	92
Supplemental Figure S7 <i>MYD88</i> L265P ABC DLBCL RT-MLPA profiles .....	93
Supplemental Figure S8 <i>MYD88</i> L265P ABC DLBCL RT-MLPA profiles .....	94
Supplemental Figure S9 EBV positive DLBCL RT-MLPA profiles .....	95
Supplemental Figure S10 EBV positive DLBCL RT-MLPA profiles .....	96
Supplemental Figure S11 EBV positive DLBCL RT-MLPA profiles .....	97

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ABC : *Activated B-Cell like*

BCR : *B-Cell Receptor*

CNV : *Copy Number Variations*

COO : *Cell of Origin*

EBV : Epstein-Barr Virus

ECOG : *Eastern Cooperative Oncology Group*

FISH : *Fluorescence In Situ Hybridization*

GCB : *Germinal Centre B-Cell like*

GEP : *Gene Expression Profiling*

FISH : *Fluorescence in situ hybridization*

HHV-8 : *Herpesvirus Humain de type 8*

IHC : Immunohistochimie

IPI : Index Pronostique International

LBDGC : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules

LySA : *Lymphoma Study association*

NGS : *Next-Generation Sequencing*

NOS : *Not Otherwise Specified*

NGS : *Next-Generation Sequencing*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PMBL : *Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma*

R-CHOP : rituximab, cyclophosphamide, adriamycine, vincristine, prednisone

RT-MLPA : *Retro-Transcriptase Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*

TEP/TDM : Tomographie par émission de positons couplée à un tomodensitomètre



# 1 LES LYMPHOMES B DIFFUS A GRANDES CELLULES

## 1.1 HISTORIQUE DE LA CLASSIFICATION DES LYMPHOMES

### 1.1.1 XIX<sup>EME</sup> SIECLE : PREMIERE DESCRIPTION DES LYMPHOMES

La première observation de lymphomes a été publiée par Thomas Hodgkin en 1832, sous le nom de "désordre des glandes absorbantes et de la rate"<sup>1</sup>. A l'époque, il décrit l'autopsie complète de 7 cadavres atteints de la même pathologie et remarque l'unicité du système lymphatique et de la rate qui deviendra plus tard le système réticulo-endothélial. Il interprète ce nouvel état comme un désordre inflammatoire ou infectieux du ganglion, ce qui lui vaudra de passer à la postérité.

### 1.1.2 FIN DU XIX<sup>EME</sup> SIECLE : PREMIERE VISION CELLULAIRE

Les premières données histologiques viennent fonder l'anatomie pathologique moderne notamment grâce à Rudolf Virchow, à qui l'on doit le paradigme: "chaque cellule est issue d'une autre cellule" qui est à la base du concept de clonalité. Les microscopes sont alors des monoculaires sans condenseur, qui permettent à Virchow de décrire le ganglion lymphatique comme une glande produisant des cellules sanguines à partir de follicules. Il pose l'hypothèse d'un filtre ganglionnaire permettant le lien entre courant lymphatique et courant sanguin<sup>2</sup>. Virchow est d'abord à l'origine du mot leucémie en constatant le *Weissenblut*, blanchiment du sang associé à la présence de cellules anormales qu'il distingue des états inflammatoires ou infectieux, avant de décrire un *lymphosarkoma* pour désigner une tumeur ganglionnaire primitive. L'utilisation de ce terme vient du fait qu'à cette époque, le terme "lymphome" désigne une augmentation de volume d'un ganglion lié à des pathologies bénignes ou malignes<sup>3</sup>. Le terme lymphosarcome parfois encore utilisé sera ensuite remplacé par le terme lymphome malin qui persiste encore aujourd'hui, bien que l'appellation lymphome se suffise à elle-même<sup>4</sup>.

L'amélioration des techniques de microscopie et les coupes histologiques voient bientôt Rudolf Sternberg (1898) puis Dorothy Reed (1902) décrire des cellules géantes à noyau bilobé, avec un macro-nucléole en œil de hibou chez des patients atteints de la maladie de Hodgkin<sup>5-7</sup>. A noter que Sternberg n'a jamais clairement réussi à distinguer la

maladie de Hodgkin d'une tuberculose active, car plusieurs de ces patients étaient atteints des deux pathologies<sup>8</sup>. La cellule géante dite de "Reed-Sternberg" deviendra la première description cytologique pathognomonique d'une maladie, peu avant la drépanocytose et ses hématies falciformes qui feront l'objet d'une publication en 1910<sup>9</sup>.

### 1.1.3 DEBUT DU XXEME SIECLE :

James Ewing utilise à partir de 1913 le terme "réticulaire" pour désigner les grandes cellules retrouvées dans certains sarcomes. En 1919, lorsqu'Ewing publie son ouvrage *Neoplastic diseases, a text-book on tumors*<sup>10</sup>, il semble y avoir débat sur le fait que les cellules réticulaires se transforment ensuite en lymphocytes ou s'il s'agit de deux cellules complètement différentes. Les pathologistes de l'époque semblent cependant s'accorder sur l'existence de quatre types de tumeurs ganglionnaires (Tableau 1).

**Tableau 1 Tumeurs ganglionnaires du début du XX<sup>ème</sup> siècle**

Maladie de Hodgkin	Cellules de Reed-Sternberg
Lymphosarcome	Petites cellules ressemblant à des lymphocytes
Réticulosarcome	Grandes cellules ressemblant à des cellules réticulaires du système réticulo-endothélial
Lymphoréticulosarcome	Mélange de petites et grandes cellules

Une première classification officielle est proposée par Callender en 1934, utilisant en plus de la taille des cellules, l'architecture nodulaire ou diffuse de l'envahissement, ainsi que le caractère leucémique ou non de la tumeur. Les autres classifications marquantes seront celles de Gall et Mallory (1942), purement morphologique, et celle de Robb-Smith (1938), plus complexe. Jusqu'à cette époque, les classifications souffrent du manque de connaissance du système immunitaire et ne semblent pas satisfaisantes, en témoignent les nouvelles classifications régulièrement proposées. De plus, il est possible que les mêmes termes aient désigné des maladies différentes pour les auteurs comme le réticulosarcome, représentant 3,6% des lymphomes d'une série décrite par Warren et Picena en 1941 et 94% d'une autre étudiée par Sugarbaker et Craver en 1940<sup>11</sup>.

### 1.1.4 1950-1960 : LA RUPTURE CONCEPTUELLE DE RAPPAPORT

Gall et Rappaport s'associent et reprennent le terme "nodulaire" de la classification de Callender pour définir le lymphome folliculaire ; ils suggèrent ensuite que

l'envahissement de tous les lymphomes peut être nodulaire ou diffus indépendamment du type de cellules. Rappaport remplace le terme de *cellule réticulaire* par le terme *histiocytaire*, ce qui se révélera un choix peu judicieux compte tenu des découvertes ultérieures, et le terme de *cellule souche* de Gall et Mallory par *cellule indifférenciée*. Enfin, il cesse d'utiliser le terme de lymphosarcome et lui préfère le terme de lymphome lymphocytaire (Tableau 2).

**Tableau 2 Classification des lymphomes non-Hodgkiniens selon Rappaport**

<b>Nodulaire</b>	<b>Diffus</b>
Lymphocytaire, moyennement différenciés Mix lymphocytaire/histocytaire Histocytaire	Lymphocytaire, bien différenciés Lymphocytaire, moyennement différenciés Mix lymphocytaire/histocytaire Histocytaire Indifférenciés Burkitt Non Burkitt

Rappaport publie initialement sa classification en 1956<sup>12</sup>. Elle deviendra la plus utilisée aux Etats-Unis, de par sa simplicité et son intérêt clinique distinguant les lymphomes de faible, intermédiaire ou haute malignité. A noter que le lymphome lymphocytaire bien différencié deviendra le lymphome lymphocytaire/LLC actuel et que le lymphome lymphocytaire moyennement différencié deviendra le lymphome du manteau.

#### 1.1.5 1960-1980 : LA REVOLUTION IMMUNOBIOLOGIQUE

Au début des années 60, Jacques Miller remarque que les souris thymectomisées à la naissance meurent prématurément et n'ont pas de petits lymphocytes circulants: c'est le début de la découverte des sous-types lymphocytaires<sup>13</sup>. Lors d'une conférence scientifique, Miller fut accusé de compliquer l'immunologie. Pourtant, la découverte des lymphocytes T, B et NK va permettre d'améliorer significativement la connaissance des cellules physiologiques du système immunitaire, et donc des cellules lymphomateuses qui leur correspondent. L'apport de l'immunohistochimie va donner rapidement naissance à la classification de Lukes-Collins (1974) aux Etats-Unis et à la classification de Kiel-Lennert (1975) en Europe, qui différencient les pathologies B et T<sup>11,14</sup>. Au début des années 80, 6 classifications différentes coexistent alors que se développent les revues scientifiques et les communications internationales. Afin de faciliter les comparaisons et dans l'idée de

développer des essais cliniques, une tentative historique de collaboration est lancée par l'institut américain du cancer afin de créer une classification consensus: la NCIWF (*National Cancer Institute Working Formulation*) qui propose une classification uniquement morphologique séparant 10 sous-types, rangés dans différents grades de malignité. Cette classification emprunte à la fois à Rappaport, Kiel-Lennert pour la classification pronostique et Lukes-Collins pour plusieurs des termes utilisés (Tableau 3).

**Tableau 3 Classifications des lymphomes malins non-Hodgkiniens utilisées dans les années 80**

*D'après Hoffbrand<sup>14</sup>. Classifications de Kiel-Lennert, Luke-Collins, Rappaport modifié et NCIWF*

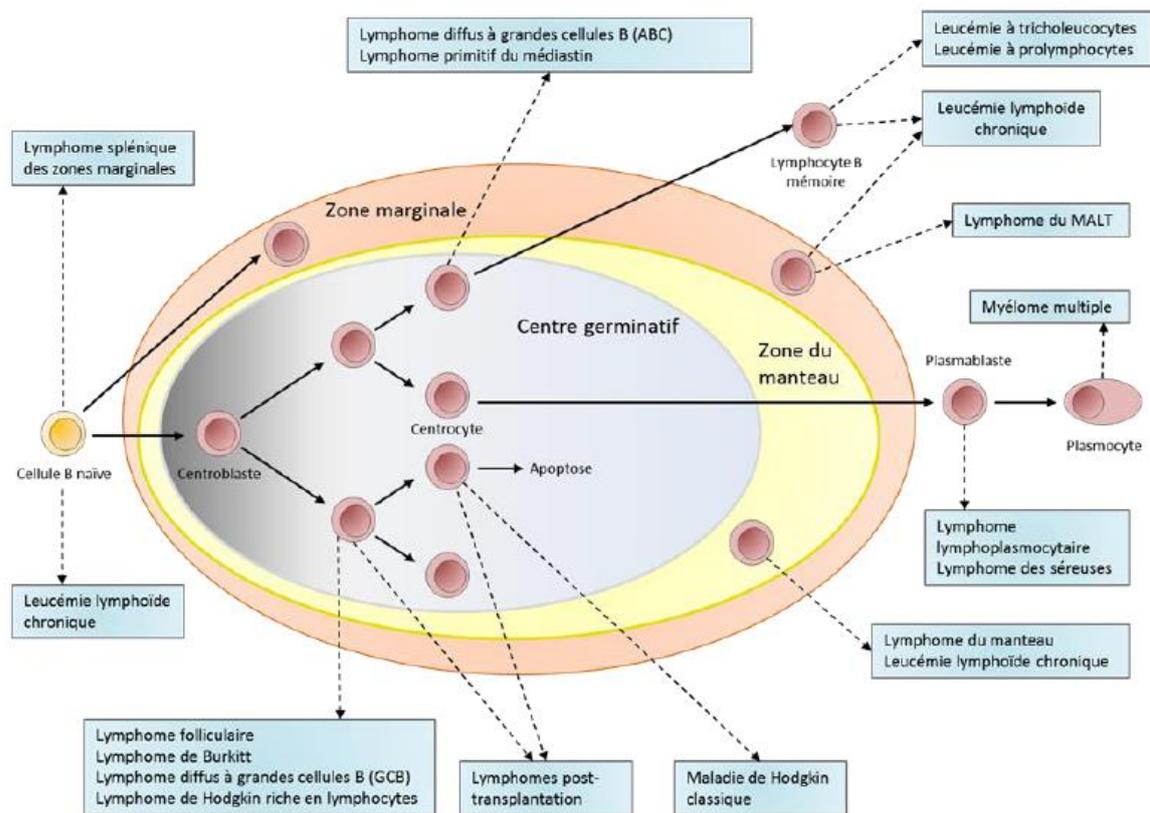
Classifications of Non-Hodgkin's Lymphomas			
Kiel (Lennert)	Lukes-Collins	Rappaport (modified)	National Cancer Institute Working Formulation
<p><b>Low-grade malignancy</b> lymphocytic (including CLL, hairy cells &amp; others) lymphoplasmacytoid centrocytic centrocytic/centroblastic follicular follicular &amp; diffuse diffuse cutaneous T cell group T-zone lymphoma</p> <p><b>High-grade malignancy</b> centroblastic lymphoblastic [B, T (convoluted) or Burkitt types] immunoblastic (B or T)</p> <p><b>True histiocytic tumours</b></p>	<p><b>Undefined</b></p> <p><b>B cell</b> small lymphocytic plasmacytoid (lymphocytic) follicular centre cell (FCC) types (nodular or diffuse): small cleaved large cleaved large non-cleaved immunoblastic sarcoma</p> <p><b>T cell</b> small lymphocytic convoluted lymphocytic cerebriform (cutaneous) lymphoepithelioid immunoblastic sarcoma</p> <p><b>Histiocytic</b></p>	<p><b>Nodular and/or diffuse</b> poorly differentiated lymphocytic mixed Burkitt's undifferentiated non-Burkitt's 'histiocytic'</p> <p><b>Diffuse</b> well differentiated lymphocytic (WDL) WDL with plasmacytoid differentiation intermediate lymphocytic immunoblastic lymphoblastic 'Lennert' type mycosis fungoides plasmacytoma unclassifiable malignant histiocytosis</p>	<p><b>Low-grade malignancy</b> A. small lymphocytic with or without plasmacytoid differentiation B. follicular, small cleaved C. follicular, mixed small cleaved &amp; large cell</p> <p><b>Intermediate-grade malignancy</b> D. follicular, large cell E. diffuse, small cleaved F. diffuse, mixed small &amp; large cell G. diffuse, large cell</p> <p><b>High-grade malignancy</b> H. large cell immunoblastic I. lymphoblastic (convoluted or non-convoluted) J. small non-cleaved cell (Burkitt &amp; non-Burkitt types)</p> <p><b>Miscellaneous</b> composite histiocytic mycosis fungoides hairy cell unclassifiable others</p>

### *1.1.6 REAL CLASSIFICATION DE 1994 : L'ONCOGENESE PAR TRANSLOCATION CHROMOSOMIQUE*

L'expansion de la cytogénétique et de la biologie moléculaire va permettre la mise en évidence des grandes altérations génétiques récurrentes dans les lymphomes. La translocation 8-14 est décrite dans la majorité des cas de lymphomes de Burkitt, correspondant à une translocation de l'oncogène *C-MYC* situé sur le chromosome 8 avec le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines situé sur le chromosome 14. Les lymphomes présentant une translocation 14-18 avec dérégulation du gène anti-apoptotique *BCL2* vont être redéfinis en lymphome folliculaire, tandis que les lymphomes du manteau sont caractérisés par une translocation 11-14 impliquant une dérégulation transcriptionnelle de l'oncogène *CCND1*<sup>3</sup>. Ces avancées vont être le point de départ d'une classification qui va rompre le clivage entre les continents, la REAL classification (*Revised European-American Lymphoma*)<sup>15</sup>. La maladie de Hodgkin devient le lymphome de Hodgkin et les syndromes lymphoprolifératifs B matures se divisent en 12 sous-types et incluent les pathologies plasmocytaires. Dans cette classification, 2 entités particulières de lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) font leur apparition: le lymphome primitif des séreuses et le lymphome primitif du médiastin.

### *1.1.7 CLASSIFICATIONS OMS 2001 ET 2008 : PUCES A ADN ET BIOLOGIE MOLECULAIRE*

Les progrès de la génétique et de l'informatique aboutissent au développement des puces à ADN qui permettent l'étude de l'expression de milliers de gènes sur un échantillon. La meilleure compréhension physiopathologique de ces pathologies permet de proposer la cellule d'origine de chaque tumeur, équivalent cellulaire normal dont elle est issue (Figure 1).



**Figure 1 Classification des syndromes lymphoprolifératifs selon leur cellule d'origine**

D'après Dubois<sup>16</sup> (Adapté d'après Küppers et al.<sup>17</sup>). Maturation des lymphocytes B à travers un follicule: passage dans le centre germinatif, la zone du manteau et la zone marginale. Les flèches pleines indiquent la maturation des lymphocytes B. Les flèches en pointillés relient les lymphocytes B normaux aux syndromes lymphoprolifératifs dérivant de ces cellules.

L'étude du transcriptome dans le LBDGC conduit à la description des 2 sous-types moléculaires GCB (*Germinal Centre B-cell like*) et ABC (*Activated B-Cell like*) qui seront détaillés plus loin. Peu après paraît la classification de l'OMS 2001 qui intègre des données épidémiologiques, cliniques, morphologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques, moléculaires et thérapeutiques pour chaque hémopathie maligne<sup>18</sup>. Le comité de conseil clinique de la classification OMS 2001 précise qu'aucune donnée clinique ou biologique ne soutient le besoin de sous-classifier les LBDGC mais le développement de techniques de classification est encouragé afin de pouvoir conduire des études rétrospectives. Bientôt, la classification OMS 2008 voit le jour et préconise l'utilisation en pratique courante de certains examens de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) et biologie moléculaire<sup>19</sup>. Des formes intermédiaires font leur apparition et sont désignées comme provisoires, comme le lymphome intermédiaire entre le LBDGC et le lymphome de Burkitt, d'évolution

très agressive, qui présente fréquemment une translocation des oncogènes *MYC* et *BCL2* (le lymphome est alors qualifié de *double hit*). De la même façon, des similitudes moléculaires entre le lymphome de Hodgkin et le DLBCL sont mises en évidence. La classification des LBDGC en sous-type ABC ou GCB n'impose pas une différence de prise en charge, et il est souligné qu'il n'existe pas de test diagnostique de profil d'expression génique de routine disponible.

#### *1.1.8 MISE A JOUR 2016 DE LA CLASSIFICATION OMS : LE NGS AU SERVICE DES THERAPIES CIBLEES*

Cette mise à jour sous forme d'article<sup>20</sup> distingue 2 sous-types de lymphomes du manteau selon les voies moléculaires impliquées. Concernant les LBDGC, il est désormais recommandé de déterminer au diagnostic le sous-type GCB/ABC qui pourrait prochainement impacter le choix des traitements. La détermination peut se faire par des algorithmes d'immunohistochimie mais le *Gold Standard* reste les puces à ADN. Les techniques de profil d'expression génique sont décrites comme une alternative prometteuse. Des lymphomes B de haut grade co-exprimant *MYC* et *BCL2*, appelés *double expressor*, ont également été identifiés comme ayant un pronostic sombre. La classification complète des hémopathies lymphoïdes issue de la révision 2016 de la classification OMS figure en annexe 1.

L'accès à la biologie moléculaire et au séquençage haut-débit se démocratisent et permettent d'envisager une détermination systématique des anomalies les plus fréquentes, s'intégrant dans un projet de médecine personnalisée. Couplées à la connaissance des anomalies moléculaires déterminantes dans la lymphomagenèse, des thérapies ciblées sont développées. En plus de l'intérêt diagnostique et pronostique, la biologie du lymphome tend donc à avoir un rôle théranostique permettant de coupler diagnostic moléculaire et traitement ciblé pour obtenir une réponse optimale. De nombreuses molécules sont maintenant disponibles (Inhibiteurs d'*EZH2*, *BCL2*, *SYK*, *XPO1*...), mais les différentes stratégies et combinaisons de molécules restent à définir et font l'objet de nombreux essais cliniques actuellement.

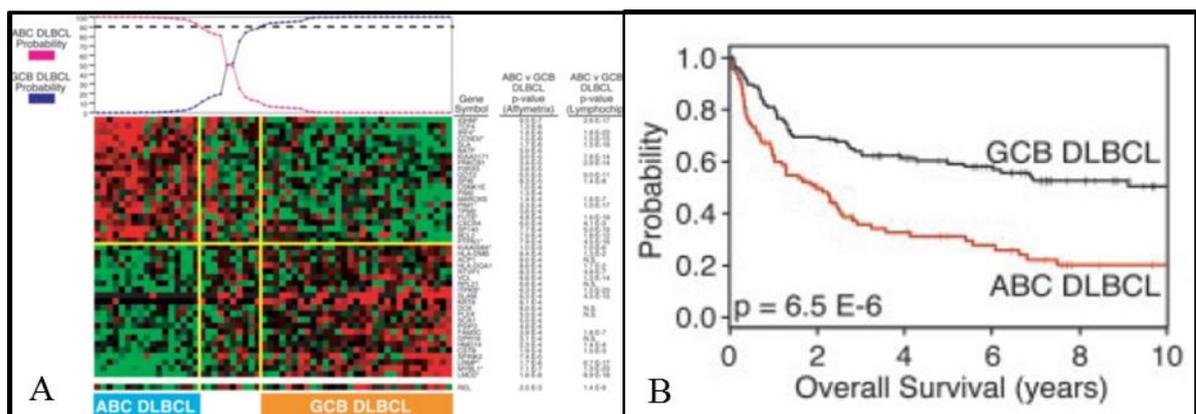
## 1.2 CLASSIFICATION ACTUELLE DES LBDGC

### *1.2.1 LBDGC, NOS*

#### **1.2.1.1 Caractéristiques communes**

Le lymphome B diffus à grandes cellules est caractérisé par un envahissement ganglionnaire de cellules B anormalement larges, représentant environ le double d'un lymphocyte normal. La structure en follicules compacts du ganglion est partiellement ou complètement dénaturée par l'envahissement que l'on qualifie de diffus. Trois variants morphologiques existent, bien que peu informatifs et manquant de reproductibilité : centroblastique (composé de centroblastes), immunoblastique (composé d'immunoblastes) et anaplasique (composé de cellules géantes et cohésives). Les cellules tumorales expriment les marqueurs de la lignée B : CD19, CD20, CD22 et CD79A. Le marqueur de prolifération Ki67 est habituellement fortement exprimé. L'avènement du séquençage haut-débit a permis de mettre en évidence dans ces tumeurs un certain nombre de mutations impliquées dans diverses voies fondamentales, notamment l'immunité (*CD58*, *TNFRSF14*, *B2M*) ou le cycle cellulaire (*TP53*, *BCL2*).

Les tumeurs ne pouvant pas être classées dans les autres catégories qui seront décrites ci-dessous sont classés en LBDGC, *NOS* (*Not Otherwise Specified*), groupe qui représente 92% des diagnostics de lymphomes B diffus à grandes cellules. Les profils d'expression génique (GEP) ont permis de mettre en évidence 2 sous-types moléculaires au sein des LBDGC, *NOS* qu'il convient de distinguer de par leur physiopathologie et les pronostics différents qui en découlent (Figure 2) : le sous-type GCB (*Germinal Centre B-cell like*) et le sous-type ABC (*Activated B-Cell like*).



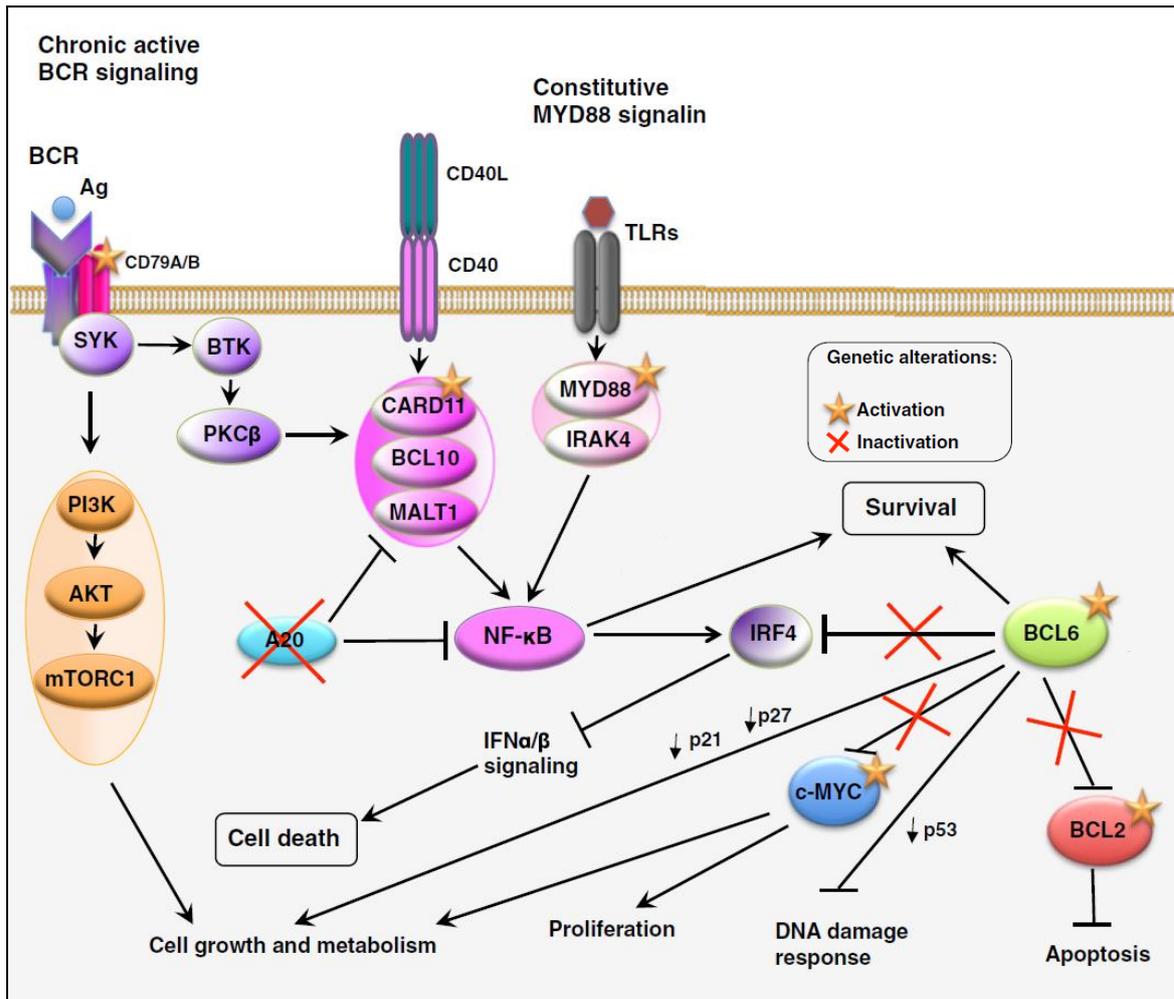
**Figure 2 Prédiction du sous-type par GEP et courbes de survie globale en fonction du sous-type**  
Adapté d'après Wright et al<sup>21</sup>. **A.** L'analyse des GEP sur puces à ADN permet de classer les LBDGC en 2 sous-types moléculaires principaux : GCB (*Germinal Centre B-cell like*) et ABC (*Activated B-Cell like*) **B.** Le sous-type ABC est associé à un pronostic péjoratif. GEP : Profils d'Expression Génique.

### 1.2.1.2 Sous-type GCB

Le sous-type GCB représente environ 40% des cas et la survie à 5 ans est supérieure à 70%. Les cellules tumorales des LBDGC de type GCB ont un profil d'expression génique proche des cellules du centre germinatif, lieu de prolifération et d'hypermutation somatique. Les cellules tumorales expriment *CD10/MME*, *BCL6* et *LMO2*. Une translocation 14-18 est retrouvée dans 40% cas. Cette anomalie juxtapose l'oncogène *BCL2* et l'*enhancer* du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines, induisant un effet anti-apoptotique par surexpression de *BCL2*. Des amplifications de *REL* sont également fréquentes. Le profil mutationnel est dominé par des anomalies épigénétiques, notamment des mutations de *CREBBP* ou encore d'*EZH2* (*Enhancer of Zeste Homologue 2*) retrouvées dans 22% des cas. Ce gène code pour une histone méthyltransférase impliquée dans la répression transcriptionnelle. Des mutations récurrentes en position Y646 entraînent un gain de fonction de la protéine. La délétion du gène suppresseur de tumeur *PTEN* peut être retrouvée dans 10% des cas.

### 1.2.1.3 Sous-type ABC

Le sous-type ABC représente 40% des cas et seulement 30% des patients survivent à 5 ans. Une plus grande fréquence de rechute est également observée. Il est caractérisé par un profil d'expression génique de type post-centre germinatif proche de celui des lymphocytes B périphériques activés, avec activation constitutive du BCR (*B-cell receptor*) et de la voie NF- $\kappa$ B. Les cellules tumorales dérivent d'un stade précoce de différenciation plasmocytaire et un plus grand nombre d'immunoblastes est retrouvé à l'examen microscopique. Les cellules tumorales expriment *IRF4* et *BCL2*. Des translocations impliquant *BCL6* et le gène des immunoglobulines sont observées, ainsi que des amplifications de *BCL2* et des délétions de *CDKN2A/B*. Le profil mutationnel de ces tumeurs est dominé par des mutations en position Y196 du gène *CD79B* impliqué dans la signalisation du BCR (18% des cas) ainsi que la mutation *MYD88* L265P retrouvée dans 30% des ABC. Ce variant récurrent entraîne un gain de fonction à l'origine d'une activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B en provoquant l'assemblage spontané des protéines *IRAK1* et *IRAK4* (Figure 3), à l'origine d'une inhibition de l'apoptose et d'une prolifération cellulaire. Des mutations de *CARD11*, impliqué plus tardivement dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, sont également détectées dans 10% cas. Il est à noter que la proportion de sous-types ABC augmente avec l'âge.



**Figure 3 Représentation de la voie du BCR et de la voie NF-κB**

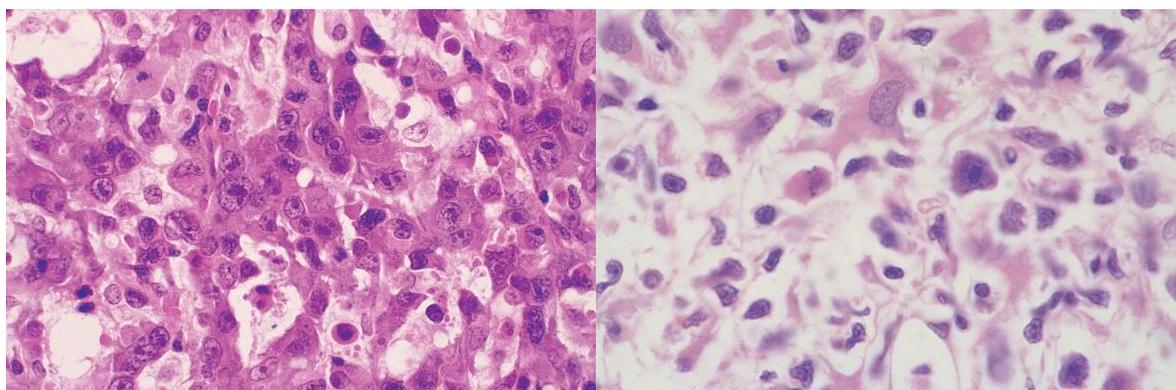
Adapté d'après Camicia et al.<sup>22</sup>. Les mutations activatrices de *CD79B* et *MYD88* aboutissent à une activation de la voie NF-κB qui stimule la survie des cellules tumorales. BCR : *B-Cell Receptor*

### 1.2.2 LBDGC EBV+

Ces tumeurs sont caractérisées par une infection chronique par l'EBV, qui peut être objectivée par l'expression du marqueur *EBER* (*Epstein-Barr virus-encoded small RNA*) en hybridation *in situ*. Les atteintes extra-ganglionnaires sont fréquentes. La prévalence de ces tumeurs est estimée à 5-15% des LBDGC, cependant ces lymphomes sont probablement sous-diagnostiqués car ce marqueur n'est pas systématiquement recherché au diagnostic. Dans l'ère pré-rituximab, les études cliniques montraient que le pronostic était plus péjoratif pour les LBDGC, EBV+ que pour les LBDGC, NOS<sup>23</sup>. Cependant, les études portant sur des cohortes de patients traités par R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, adriamycine, vincristine, prednisone) ne montrent pas de différence de survie<sup>24</sup>.

### 1.2.3 LBDGC RICHES EN LYMPHOCYTES T ET EN HISTIOCYTES

Ces LBDGC sont caractérisées par des cellules tumorales noyées dans un contingent majoritaire de cellules réactionnelles (Figure 4). La classification OMS requiert que les cellules néoplasiques représentent moins de 10% de l'infiltrat de cellules. Cette particularité les rend particulièrement difficile à étudier, que ce soit par profil d'expression génique ou par séquençage. Actuellement, la contrepartie normale supposée de ces cellules est une cellule B du centre germinatif d'après une étude portant sur 6 patients<sup>25</sup>. Ils représentent moins de 10% des LBDGC et ont un pronostic sombre.



**Figure 4 Aspect microscopique d'un LBDGC et d'un sous-type riche en lymphocytes T et en histiocytes**

Adapté d'après Bain et al.<sup>26</sup>. Examen microscopique d'une coupe de biopsie de moelle osseuse atteinte de LBDGC (à gauche) et d'un LBDGC riche en lymphocytes T et en histiocytes (à droite). Prélèvements conservés en paraffine, coloration H&E, grossi 100 fois.

### 1.2.4 LBDGC CUTANES PRIMITIFS DE LA JAMBE (LEG-TYPE)

Il s'agit d'un sous-type défini par la localisation cutanée de la tumeur primaire, qui se développe sur les parties inférieures des jambes dans 85% cas. Ces tumeurs touchent préférentiellement les femmes âgées, et la survie à 5 ans est de 50%.

### 1.2.5 LBDGC PRIMITIFS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Comme le lymphome de la jambe, il se définit par la localisation de l'atteinte initiale. Il ne doit pas être confondu avec une atteinte cérébrale d'un LBDGC ayant pris son origine ailleurs. La localisation rend l'étude de ces lymphomes difficile. Les analyses moléculaires sur des cohortes de patients ont montré que ces tumeurs présentaient un sous-type moléculaire de type ABC, via des profils d'expression génique et des mutations associées, notamment la mutation récurrente *MYD88* L265P présente dans 65-95% cas selon les études<sup>27,28</sup>.

### 1.2.6 LYMPHOMES APPARENTES AUX LBDGC

Certains lymphomes à grandes cellules présentent des similitudes avec les LBDGC :

- **LBDGC primitifs du médiastin (PMBL)**

Le lymphome primitif du médiastin est une entité clinique et biologique distincte qui se présente le plus souvent sans atteinte de la moelle osseuse ou d'un autre ganglion au diagnostic. Il concerne environ 10% des LBDGC et est plutôt de bon pronostic. Ces tumeurs sont fréquemment assimilées à un troisième sous-type de LBDGC, *NOS*. Il se manifeste par une tumeur dans la région thoracique survenant classiquement chez la femme jeune (30-40 ans), qui prendrait son origine de lymphocytes B thymiques. Le diagnostic anatomo-pathologique est parfois difficile et fait appel à la positivité des marqueurs CD23, CD30 et MAL. Les immunoglobulines de surface sont fréquemment absentes. Les anomalies moléculaires et les profils d'expression génique de ces tumeurs suggèrent de fortes similitudes entre les PMBL et les lymphomes de Hodgkin : ils partagent une faible expression des composants de la voie du BCR, une forte expression des membres de la voie JAK/STAT, de fréquentes amplifications de la région 9p24 abritant *JAK2*, *PDL1* et *PDL2*, et des mutations de *STAT6* et *SOC31*. Récemment, il a été montré que le gène *XPO1* était muté dans 25% des PMBL et des lymphomes de Hodgkin, renforçant la parenté entre ces 2 entités<sup>29,30</sup>. De manière générale, les PMBL ont été décrits comme présentant une charge mutationnelle plus importante que les LBDGC de sous-type GCB et ABC<sup>31</sup>.

Il peut être difficile de différencier les PMBL des atteintes médiastinales secondaires des LBDGC. De plus, il a récemment été mis en évidence que certains lymphomes présentant un profil phénotypique et moléculaire de PMBL pouvaient ne pas présenter d'atteinte médiastinale au diagnostic<sup>32</sup>, posant la question de la classification de ces tumeurs en PMBL ou LBDGC. L'arrivée progressive des thérapies ciblées renforce l'intérêt d'un diagnostic moléculaire systématique afin de différencier ces formes atypiques.

D'autres lymphomes, plus rares, peuvent être apparentés aux LBDGC :

- LBDGC intravasculaires
- LBDGC associés à une inflammation chronique
- Granulomatose lymphomatoïde
- LBDGC ALK+

- Lymphome plasmablastique
- LBDGC associés à la maladie de Castleman (associés à HHV-8)
- LBDGC associés aux épanchements

## 1.3 DIAGNOSTIC

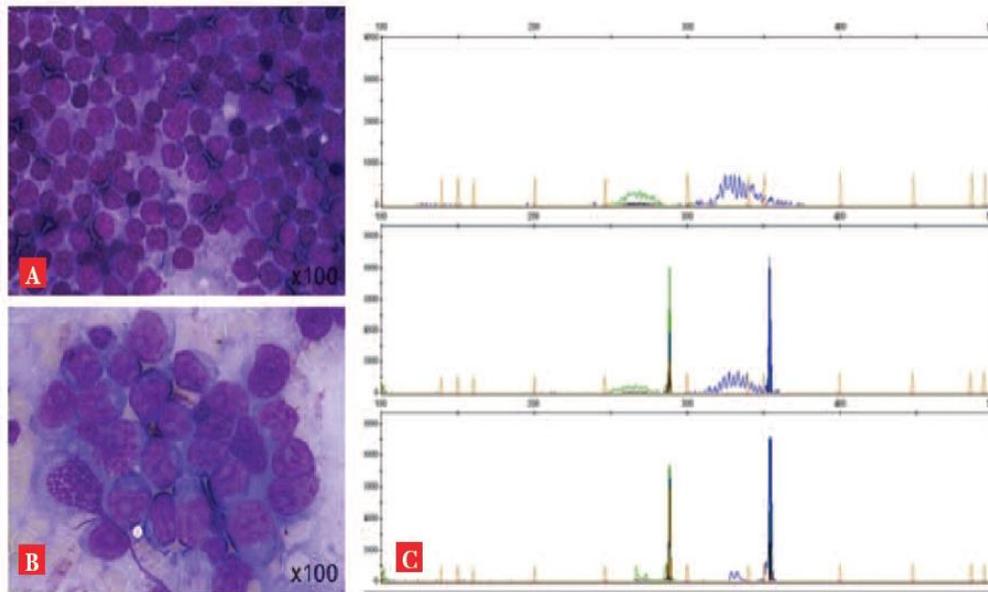
### 1.3.1 PRESENTATION CLINIQUE

La présentation clinique de ces maladies est peu spécifique et inclut le plus souvent une asthénie ainsi qu'une ou plusieurs masses ganglionnaires d'évolution rapide. Dans un tiers des cas, l'envahissement est extra-ganglionnaire et peut se situer dans différents organes incluant fréquemment le tractus gastro-intestinal, la tête et le cou, la peau ou encore le tractus génito-urinaire. Les signes non spécifiques à rechercher sont une fièvre inexplicable  $>38^{\circ}\text{C}$  persistante plus d'une semaine, un amaigrissement de plus de 10% du poids durant les 6 derniers mois, et des sueurs nocturnes profuses. Des symptômes variables en fonction des organes atteints peuvent s'ajouter comme une toux ou une gastralgie.

Un LBDGC survient le plus souvent *de novo* mais peut aussi correspondre à la transformation d'un syndrome lymphoprolifératif de bas grade indolent (lymphome folliculaire, LLC...).

### 1.3.2 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Le diagnostic de LBDGC repose sur l'analyse anatomo-pathologique d'une biopsie tumorale réalisée par exérèse chirurgicale d'un ganglion ou d'une masse extra-ganglionnaire. Une analyse histologique complétée par l'étude des marqueurs cellulaires par immunohistochimie permettra d'objectiver les spécificités des LBDGC. Si les arguments de l'analyse anatomo-pathologique sont insuffisants pour affirmer le diagnostic (par exemple en cas de doute avec une expansion réactionnelle), une étude de la clonalité B peut être recherchée à la recherche d'un réarrangement des locus IGH et IGK, retrouvé dans 96% des LBDGC. Un autre intérêt de l'étude de la clonalité est de pouvoir établir la parenté entre deux hémopathies et de distinguer un LBDGC *de novo* d'une transformation en LBDGC d'un lymphome de bas grade (Figure 5). Les lymphomes indolents transformés sont associés à une résistance au traitement et une progression plus fréquente, et à une mortalité plus élevée<sup>33</sup> conduisant souvent à exclure les patients des études prospectives.



**Figure 5 Transformation d'une leucémie lymphoïde chronique en LBDGC**

D'après Derrieux et al<sup>34</sup>. **A.** Leucémie lymphoïde chronique. Petits lymphocytes matures, monomorphes, dont la chromatine nucléaire est mottée, observés dans un ganglion cervical. **B.** Transformation en lymphome B diffus à grandes cellules. Nappe dense de cellules lymphoïdes de grande taille, nucléolées et au cytoplasme basophile, observées dans un ganglion jugulo-carotidien. **C.** Mise en évidence de la parenté clonale entre les deux hémopathies malignes. Profils de migration électrophorétique de produits de PCR *IGH* VDJ FR1 et FR2 fluorescents générés à partir de l'ADN extrait de lymphocytes témoins polyclonaux (haut), du ganglion cervical (milieu) et du ganglion jugulo-carotidien (bas). Les profils obtenus à partir des deux ADN tumoraux sont identiques, avec des réarrangements clonaux de taille similaire.

### 1.3.3 EVALUATION INITIALE DU PATIENT

La stadification du patient au diagnostic se fait par plusieurs évaluations permettant de définir des critères de réponse au traitement. La classification d'Ann-Arbor est utilisée pour évaluer l'extension de la maladie et graduer l'envahissement de l'organisme en 4 niveaux de gravité (Tableau 4).

**Tableau 4 Classification d'Ann-Arbor**

Stade I	Un ganglion tumoral, envahissement éventuel des tissus voisins
Stade II	Plusieurs sites tumoraux du même côté du diaphragme
Stade III	Plusieurs sites ganglionnaires de part et d'autre du diaphragme
Stade IV	Une ou plusieurs atteintes viscérales (extra-ganglionnaires)

L'état général du patient est évalué par un score de gravité croissante élaboré par l'ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*), qui va conditionner l'intensité du traitement (Tableau 5).

**Tableau 5 Score de gravité ECOG**

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

L'index pronostique international ou IPI est un score dédié aux lymphomes non hodgkiniens introduit en 1993 et combinant plusieurs facteurs pronostiques permettant de définir des patients à haut risque, risque intermédiaire ou faible risque. Ce score constitue un paramètre pronostique indépendant permettant de prédire l'évolution du patient. Cinq éléments sont pris en compte dans son calcul. Le score est égal à la somme de facteurs défavorables et permet de classer les patients en 4 groupes pronostiques (Tableau 6).

**Tableau 6 Calcul du score IPI et groupe pronostique**

Variable	Facteur défavorable	Score IPI	Pronostic
Age	>60 ans	0	Faible risque
Taux de LDH	Élevé	1	Faible risque intermédiaire
ECOG	2-4	2	Haut risque intermédiaire
Ann-Arbor	III-IV	3-5	Haut risque
Nombre d'organes atteints	>1	<b>1 point par facteur défavorable</b>	

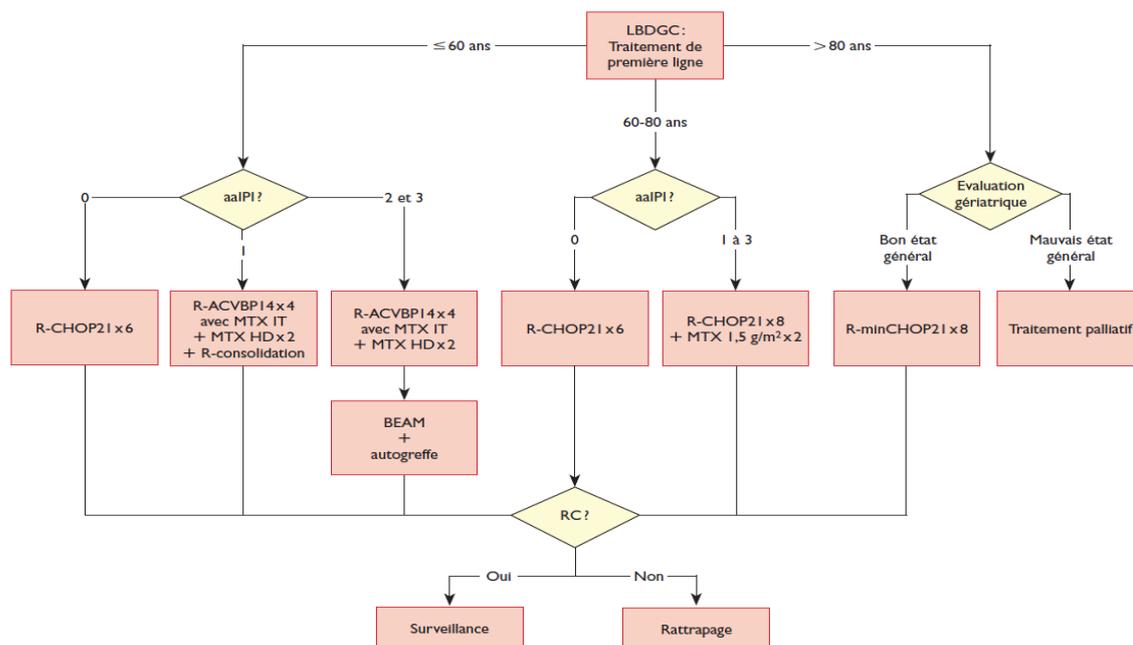
Des scores dérivés existent comme l'IPI ajusté à l'âge (aaIPI) qui tient uniquement compte du taux de LDH, de l'ECOG et du stade d'Ann-Arbor ; ou l'IPI révisé (R-IPI) qui prédit mieux la survie pour les patients traités avec du rituximab. D'autres équipes ont proposé des scores alternatifs qui semblent efficaces mais restent peu appliqués en pratique.

#### 1.4 TRAITEMENT STANDARD

L'utilisation du rituximab, anticorps monoclonal anti-CD20, a permis des progrès thérapeutiques majeurs depuis les années 2000, bien que le pronostic reste mitigé avec une

survie globale à 5 ans proche de 60%<sup>35</sup>. Le traitement actuel est basé sur des cures d'immuno-chimiothérapie de type R-CHOP. Une version atténuée, le R-miniCHOP, fait preuve d'une certaine efficacité et d'une tolérance acceptable chez les patients âgés de plus de 80 ans<sup>36</sup>. Des programmes de chimiothérapies intensives plus agressives que le traitement par R-CHOP existent, notamment le programme R-ACVBP (rituximab, adriamycine, vindésine, bléomycine, prednisone) bien que leur place dans la stratégie thérapeutique ne soit pas consensuelle. La radiothérapie garde une indication dans les formes localisées, incluant les lymphomes primitifs du médiastin (PMBL). L'indication de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques se limite aux patients jeunes avec un aaIPI élevé. Les algorithmes thérapeutiques recommandés par le LySA (*Lymphoma Study association*) sont représentés en figure 6.

A ce jour, 30% des patients sont réfractaires (n'atteignent pas la rémission complète) ou rechutent. Différents traitements de rattrapage sont alors envisagés.



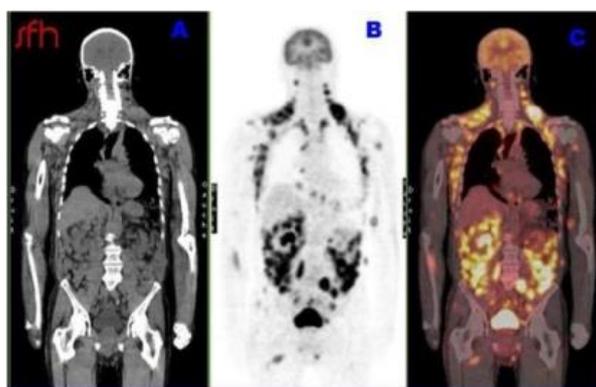
**Figure 6 Traitements de première ligne des LBDGC**

D'après Bonnet et al<sup>37</sup>. aaIPI : index pronostique international adapté à l'âge ; R-CHOP : rituximab, cyclophosphamide, adriamycine, vincristine, prednisone ; «21» : une cure tous les 21 jours ; R-ACVBP : rituximab, adriamycine, vindésine, bléomycine, prednisone ; «14» : une cure tous les 14 jours ; MTX : méthotrexate ; IT : intrathécal ; BEAM : BCNU, étoposide, aracytine, melphalan ; RC : rémission complète.

## 1.5 ÉVALUATION DE LA RÉPONSE AU TRAITEMENT

### 1.5.1 TEP/TDM

La TEP-TDM (Tomographie par émission de positons couplée à un tomodensitomètre) est une technique d'imagerie qui fusionne des images anatomiques obtenues par un scanner à rayons X (TDM) et des images métaboliques obtenues après injection d'un traceur (TEP). Ce traceur est un analogue du glucose, le 18FDG (18-fluorodésoxyglucose), qui va se fixer sur les tissus qui présentent un hypermétabolisme glucidique (Figure 7). Ces images sont utilisées en cancérologie pour évaluer le caractère malin des lésions au diagnostic, afin d'évaluer l'extension de la maladie, ainsi que lors du suivi pour évaluer la réponse au traitement. La réalisation d'une TEP-TDM fait donc partie du bilan diagnostique initial des LBDGC. Cet examen sera renouvelé après 1 à 4 cures de chimiothérapie et en fin de traitement.



**Figure 7 Images de TEP-TDM**

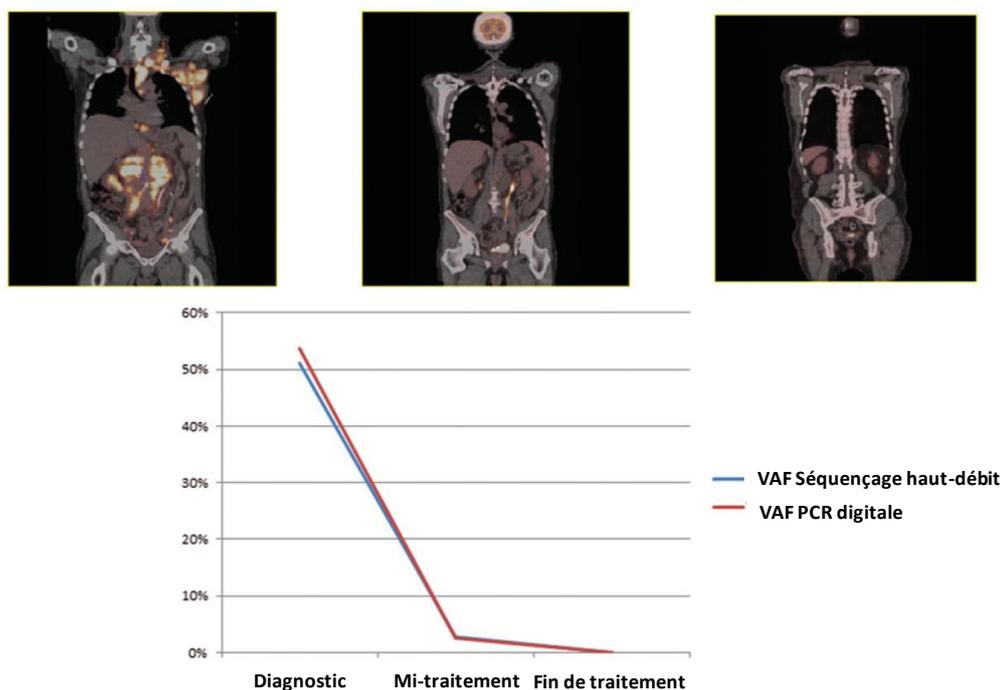
D'après le site de la Société Française d'Hématologie **A.** TDM : tomodensitomètre **B.** TEP : tomographie par émission de positons **C.** Image combinée.

La fixation maximale du traceur est mesurée par un paramètre semi-quantitatif, le SUV (*Standardized Uptake Value*). Dans les LBDGC, la différence de fixation maximale entre la TEP intermédiaire et la TEP initiale permet de définir les patients répondeurs rapides et les patients répondeurs lents en calculant le  $\Delta$ SUVmax : un patient est considéré répondeur rapide si le  $\Delta$ SUVmax est supérieur à 66% après 2 cures ou si le  $\Delta$ SUVmax est supérieur à 70% après 4 cures. Sinon, il est considéré comme répondeur lent<sup>38</sup>. L'affirmation de la rémission complète se fait en cas de négativité de la TEP-TDM en fin de traitement.

Un suivi clinico-biologique et radiologique trimestriel puis semestriel est ensuite nécessaire dans les 2 ans suivant le traitement, puisque 30% des patients vont connaître une rechute ou une progression de la maladie. La TEP ne fait pas partie des examens à réaliser systématiquement lors du suivi.

### 1.5.2 MALADIE RESIDUELLE

La mise en évidence de mutations somatiques fréquentes dans les LBDGC permet d'envisager à l'avenir un suivi moléculaire des tumeurs. En effet, la présence d'une mutation somatique chez un patient au diagnostic permet un suivi du clone tumoral par la recherche et la quantification de cette mutation en fin de traitement et à distance du traitement. Les premières études montrent que cette recherche peut s'effectuer sur ADN plasmatique circulant, obtenu par une simple prise de sang, qui permet de retrouver avec une bonne corrélation les anomalies présentes sur l'ADN ganglionnaire extrait de la biopsie<sup>39</sup>. Le séquençage haut-débit ou la PCR digitale (*digital polymerase chain reaction*) peuvent être utilisés<sup>40</sup> (Figure 8).



**Figure 8 Suivi de la fréquence allélique de la mutation MYD88 L265P dans l'ADN circulant**

Adapté d'après Camus et al.<sup>40</sup>. Quantification de la mutation par séquençage haut-débit et PCR digitale corrélée à la TEP-TDM chez un patient atteint de LBDGC. La mutation MYD88 L265P est encore détectable à mi-traitement puis devient indétectable en fin de traitement, parallèlement à la normalisation de la TEP-TDM. VAF : *Variant allele frequency* (fréquence allélique).

Le ciblage des anomalies moléculaires présentes au diagnostic va permettre une détection précoce des rechutes et s'intégrer dans une stratégie de médecine personnalisée. Cette nouvelle approche est en train de se développer dans plusieurs cancers notamment les cancers du sein<sup>41</sup>, du poumon<sup>42</sup> et colo-rectaux<sup>43</sup>. Une étude prospective est en cours dans le lymphome de Hodgkin au centre Henri Becquerel afin de déterminer si le suivi de la mutation récurrente *XPO1* E571K pourrait être utilisé comme un biomarqueur de maladie résiduelle.

## 1.6 NOUVEAUX TRAITEMENTS : THERAPIES CIBLEES

De nombreux traitements sont à l'étude dans les LBDGC et devraient permettre d'améliorer le pronostic des patients. L'hétérogénéité moléculaire de ces tumeurs, décrite en 1.2, montre la nécessité d'aborder des stratégies différentes selon le sous-type moléculaire visé. Les recherches se sont davantage focalisées sur le sous-type ABC, de pronostic plus sombre, mais des thérapies ciblées sont aussi proposées dans les sous-types GCB et PMBL. Les principales molécules en cours d'étude sont présentées ici.

### 1.6.1 SOUS-TYPE ABC

Les **Inhibiteurs de la voie du BCR et de la voie NF- $\kappa$ B** : ces voies sont caractéristiques de l'oncogenèse du sous-type ABC et de nombreuses molécules inhibent la cascade de signalisation de NF- $\kappa$ B à différents niveaux. L'ibrutinib, inhibiteur de la Bruton Tyrosine Kinase, fait actuellement l'objet d'un essai de phase 3 chez des patients atteints de LBDGC de type non-GC (détermination par l'algorithme de Hans) associé à une immunochimiothérapie R-CHOP. Un essai de phase 2 est également ouvert pour des patients réfractaires ou en rechute atteints de LBDGC de type non-GC (détermination histologique) et non candidats pour une autogreffe, traités en entretien par l'ibrutinib après un traitement incluant rituximab, gemcitabine, oxaliplatine et dexaméthasone. Il est à noter qu'un essai de phase 1/2 portant sur des patients réfractaires ou en rechute a décrit que la sensibilité à l'ibrutinib dépendrait de la présence de mutations activatrices<sup>44</sup> : sensibilité si mutations associées de *MYD88* et *CD79B*, résistance si mutations de *CARD11*.

Des **inhibiteurs de la kinase SYK** (fosfamatini) ou des **inhibiteurs de PI3K** sont également en développement.

Le **Lenalidomide** est un médicament immunomodulateur qui possède aussi des propriétés anti-angiogéniques et antiprolifératives. L'essai de phase 3 REMARC conduit par le LySA (*Lymphome Study Association*) a comparé le lenalidomide *versus* placebo en entretien chez des patients présentant un LBDGC âgés de 60 à 80 ans répondeurs au R-CHOP en première ligne. Les résultats préliminaires présentés lors du congrès de la SFH (Société Française d'Hématologie) 2017 montrent une meilleure survie sans progression, mais sans différence de survie globale, même au sein du sous-type ABC<sup>45</sup>. Ces données suggèrent que les patients répondeurs au lenalidomide doivent être identifiés plus précisément. Les données d'expression notamment d'*IRF4*, acteur de la voie NF-κB fortement exprimé dans le sous-type ABC, et de *CRBN* seraient particulièrement intéressantes à étudier dans cette cohorte puisque l'activité du lénalidomide a été décrite comme dépendante de l'expression d'*IRF4* et *CRBN in vitro*<sup>46</sup>.

### 1.6.2 SOUS-TYPE GCB

**Inhibiteurs d'*EZH2*** : les LBDGC de sous-type GCB présentent fréquemment une mutation gain de fonction d'*EZH2* leur assurant un pouvoir de prolifération. Plusieurs molécules sont en essai de phase 1 et 2 afin d'évaluer l'efficacité clinique de cette approche. Contrairement à ce qui était attendu, les premiers résultats ont observé des réponses à la fois chez les patients mutés et non mutés.

Des **inhibiteurs de *BCL2* et *BCL6*** sont également à l'étude.

### 1.6.3 PMBL

**Inhibiteurs d'*XPO1* / Inhibiteurs sélectifs de l'export nucléaire** : l'exportine 1 ou *XPO1*, fréquemment mutée en position E571K dans les PMBL, agit comme un proto-oncogène en exportant des protéines suppresseurs de tumeur dans le cytoplasme de la cellule. Les SINE (*selective inhibitors of nuclear export*) sont en développement. Actuellement en essai de phase 2, ils permettraient de conserver l'activité anti-oncogène de ces protéines. Les études *in vitro* ne montrent pas de modification de l'activité des SINE en présence du variant *XPO1* E571K<sup>29</sup>, mais l'impact de la mutation sur l'efficacité du traitement *in vivo* reste à étudier.

Des **inhibiteurs de la voie JAK/STAT** sont aussi à l'étude.

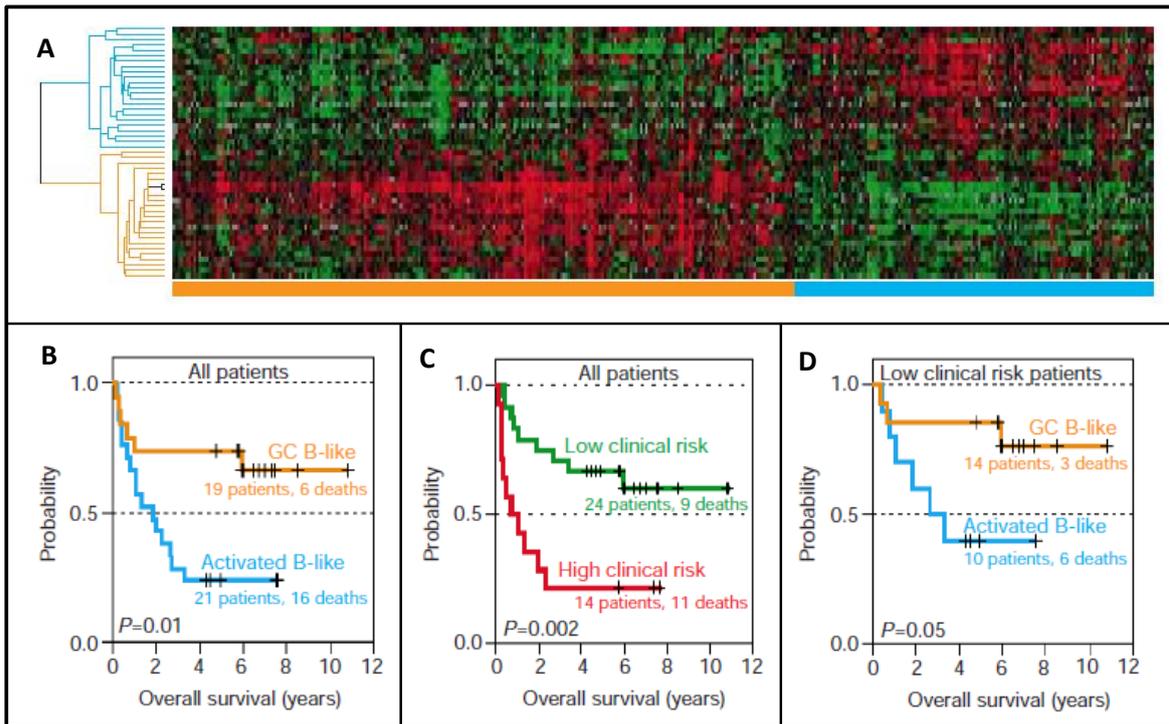
## 2 INTRODUCTION A L'ARTICLE

### 2.1 HISTOIRE DES CLASSIFICATIONS MOLECULAIRES DES LBDGC

#### 2.1.1 DECOUVERTE DES SOUS-TYPES GCB ET ABC

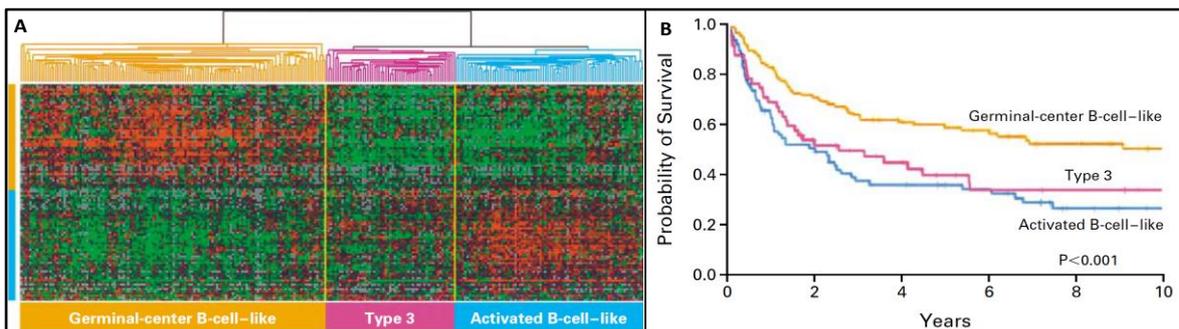
En 2000, Alizadeh *et al.* découvrent l'hétérogénéité moléculaire des LBDGC<sup>47</sup>. Ils établissent un profil d'expression génique à l'aide de micropuces à ADN complémentaires appelées Lymphochip contenant un large panel de plusieurs milliers de gènes exprimés par les lymphocytes, impliqués dans le cancer ou dans le système immunitaire. L'analyse de 40 LBDGC par un *clustering* hiérarchique non supervisé conduit à une dichotomie nette entre les tumeurs exprimant fortement les gènes retrouvés chez les lymphocytes du centre germinatif (GCB : *Germinal Centre B-cell like*) et les tumeurs avec une forte expression des gènes induits durant l'activation *in vitro* de lymphocytes B périphériques (ABC : *Activated B-Cell like*). Des différences importantes en terme de survie sont observées et suggèrent que les LBDGC GCB et ABC doivent être considérés comme des maladies différentes (Figure 9).

Ces premiers résultats sont confirmés en 2002 par Rosenwald *et al.* sur une plus large cohorte de 240 patients traités par CHOP en réduisant le profil d'expression aux 100 marqueurs les plus différenciellement exprimés entre les 2 sous-types (Figure 10). Cette étude fait apparaître un groupe intermédiaire et hétérogène, appelé *type 3* et qui sera parfois appelé *other* ou *unclassified* dans d'autres études. Ce nouveau groupe n'exprime ni les gènes caractéristiques des GCB ni ceux des ABC. Son pronostic est proche des ABC dans cette étude princeps.



**Figure 9 Découverte des sous-types de LBDGC par profil d'expression génique**

Adapté d'après Alizadeh et al.<sup>47</sup> **A.** Clustering hiérarchique des 2984 gènes différemment exprimés entre les LBDGC de type GCB (orange) et ABC (bleu). **B.** Les groupes GCB et ABC ont une survie globale différente. **C.** Analyse de survie des patients séparés par leur score IPI : 0-2 pour le groupe *low clinical risk*, et 3-5 pour le groupe *high clinical risk*. **D.** Analyse de survie au sein des patients à faible risque. Le sous-type moléculaire garde un impact pronostique important au sein de ces patients.



**Figure 10 Confirmation des sous-types moléculaires sur une cohorte de 274 patients et analyse de survie**

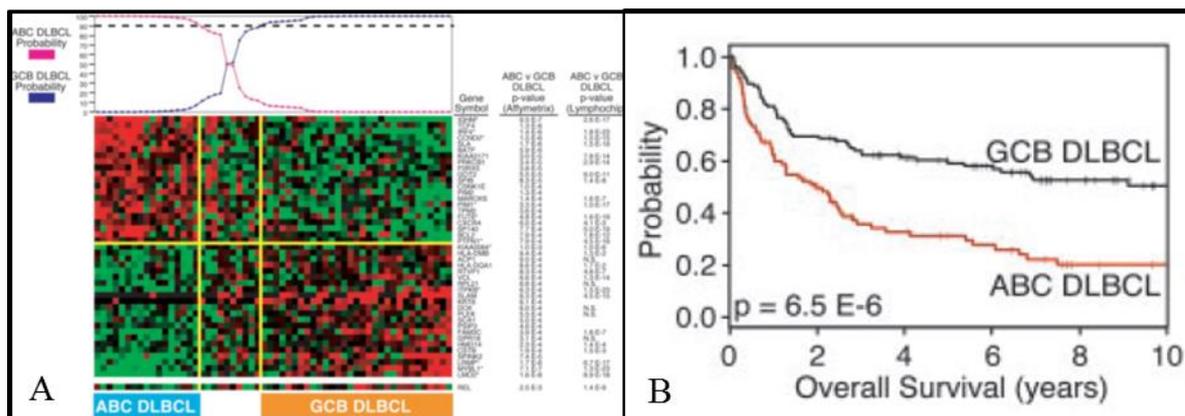
Adapté d'après Rosenwald et al. **A.** Clustering hiérarchique selon le niveau d'expression des 100 gènes les plus différemment exprimés, retrouvant les sous-types GCB, ABC et un groupe intermédiaire appelé type 3. **B.** Analyse de survie globale selon le sous-type moléculaire des 240 patients ayant été traité par CHOP

L'intérêt de cette classification moléculaire étant définitivement démontré, la question de la possibilité de déterminer les sous-types de manière prospective se pose. Dans le système de *clustering* publié, la classification individuelle d'un cas n'est pas possible sans générer un nouveau *clustering*, susceptible de déplacer les patients d'un groupe à l'autre. Cet inconvénient est l'un des éléments qui va conduire au développement d'un nouveau test.

### 2.1.2 MISE AU POINT D'UN PREDICTEUR BAYESIEN

En 2003, Wright *et al.* développent une méthode de classification des sous-types GCB et ABC qui estime la probabilité d'un échantillon d'appartenir à chaque sous-type<sup>21</sup>. Pour cela, il analyse une série d'entraînement afin de choisir les gènes les plus discriminants pour lequel il calcule des coefficients fixes selon leur pouvoir de discrimination. Pour chaque échantillon, l'expression de chaque gène est multipliée par son coefficient et un score appelé LPS (*linear predictor score*) est calculé, constitué de la somme des expressions modulés par leurs coefficients. L'application de la loi de Bayes permet de transposer ce score en probabilité à partir des données de la série d'entraînement. Les échantillons qui ne présentent pas les caractéristiques des GCB ou ABC sont considérés comme *unclassified* (Figure 11). Une série de validation est ensuite analysée afin de vérifier que le modèle est capable de classer avec exactitude des échantillons sur lesquels il n'a pas été entraîné.

Cette méthode de classification est appliquée aux résultats des puces Lymphochip des 274 patients analysés par Rosenwald *et al.*, incluant les niveaux d'expression des 27 gènes les plus discriminants. La concordance avec les résultats du *clustering* initial est de 90%. La méthode est ensuite adaptée pour analyser des résultats obtenus sur puces à ADN HU6500 commercialisées par Affymetrix (Santa Clara, CA). Pour cela, Wright *et al.* sélectionnent uniquement les 14 gènes présents sur les puces Affymetrix qui faisaient partie des 27 gènes choisis précédemment sur les puces Lymphochip. La différence pronostique entre les 2 sous-types est également retrouvée en utilisant ces données. On peut cependant noter que les données de survie du groupe *unclassified* n'apparaissent pas dans les résultats.



**Figure 11 Prédiction du sous-type par GEP et courbes de survie globale en fonction du sous-type**

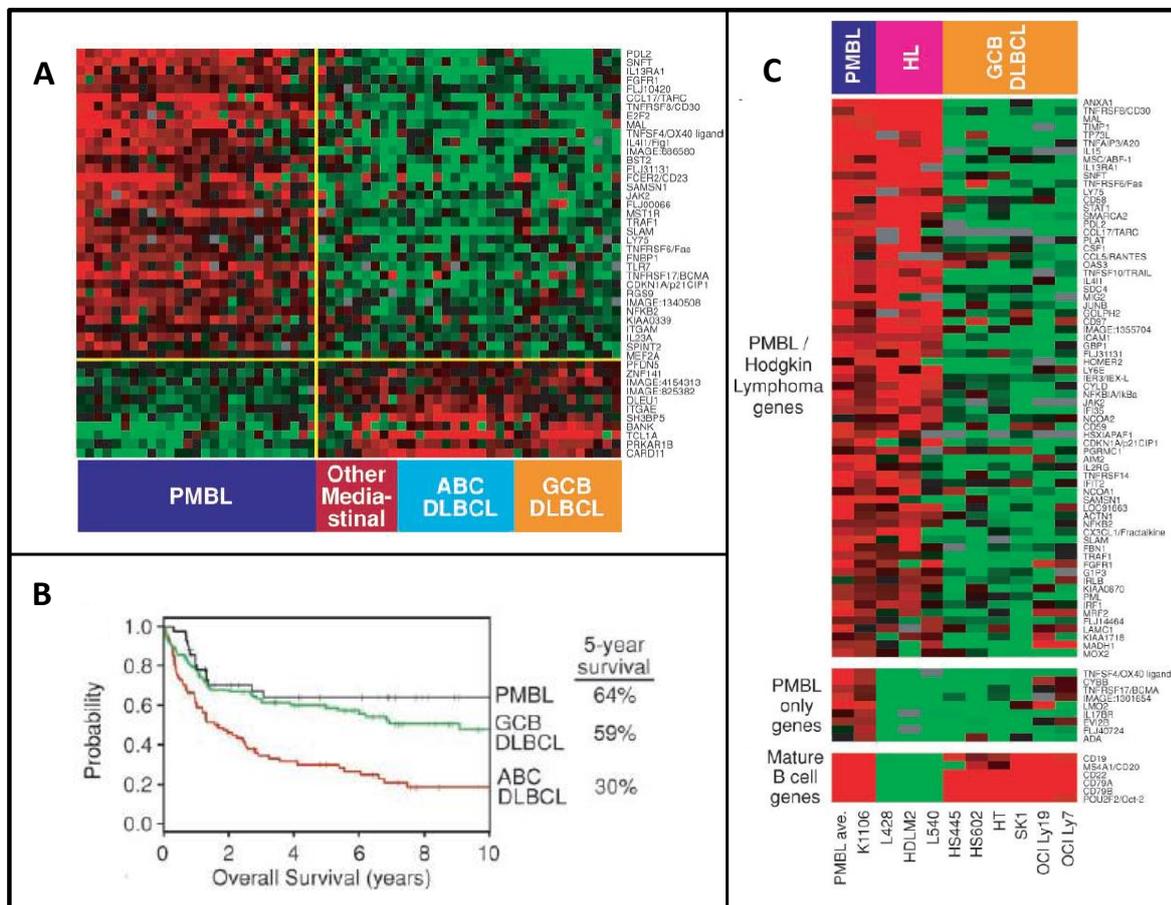
Adapté d'après Wright et al<sup>21</sup>. **A.** L'analyse des GEP sur puces à ADN permet de classer les LBDGC en 2 sous-types moléculaires principaux : GCB (*Germinal Centre B-cell like*) et ABC (*Activated B-Cell like*) **B.** Le sous-type ABC est associé à un pronostic péjoratif. GEP : Profils d'Expression Génique.

En 2008, l'étude de Lenz *et al.* confirme l'intérêt pronostique de distinguer les sous-types GCB et ABC à l'ère du rituximab sur une cohorte de 233 patients traités par R-CHOP<sup>48</sup>.

### 2.1.3 DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PMBL

Les premiers profils d'expression génique s'intéressant aux lymphomes primitifs du médiastin sont publiés par Rosenwald et al. en 2003<sup>49</sup>. Trente-cinq LBDGC avec une atteinte médiastinale chez qui le diagnostic de PMBL a été posé sont analysés sur puces Lymphochip et comparés avec 25 tumeurs définies antérieurement comme appartenant aux sous-types GCB et ABC (Figure 12). Un *clustering* hiérarchique construit sur ces données permet de mettre en évidence des gènes spécifiquement exprimés dans les PMBL, en faisant une maladie distincte au niveau moléculaire des sous-types GCB et ABC. Comme précédemment décrit, un prédicteur bayésien spécifique est développé utilisant 35 gènes spécifiquement exprimés dans les PMBL et 11 gènes spécifiquement exprimés dans les LBDGC, *NOS*. L'analyse de survie de 48 cas assignés au sous-type PMBL montre un pronostic plus favorable que dans les autres LBDGC avec une survie à 5 ans de 64%. La comparaison avec les profils d'expression génique de 3 lignées de lymphomes de Hodgkin montre que 34% des gènes de la signature PMBL sont également surexprimés dans ces tumeurs, suggérant l'existence d'anomalies moléculaires oncogéniques communes entre ces 2 maladies.

Il est à noter que certains LBDGC avec une atteinte médiastinale n'expriment pas les gènes fortement exprimés par les PMBL, laissant supposer qu'il pourrait s'agir de LBDGC qui présenteraient par hasard une atteinte médiastinale sans pour autant appartenir au groupe moléculaire des PMBL. Inversement, un article paru en 2016 décrit 6 cas de LBDGC qui expriment la signature moléculaire spécifique des PMBL sans pour autant présenter d'atteinte médiastinale<sup>32</sup>. Au sein de ces tumeurs présentant une signature moléculaire de PMBL, aucune différence en terme de caractéristique clinique n'a été retrouvée entre le groupe "avec atteinte médiastinale" et le groupe "sans atteinte médiastinale". La définition clinique du PMBL pourrait donc être outrepassée par une définition moléculaire, renforçant le besoin de disposer de tests permettant l'étude du profil d'expression génique des tumeurs de façon prospective afin de mieux classer les patients.



**Figure 12 Mise en évidence d'une signature moléculaire de PMBL**

Adapté d'après Rosenwald et al<sup>49</sup>. **A.** Développement d'un prédicteur de PMBL d'après l'expression différentielle de 46 gènes entre les PMBL et les LBDGC de sous-type GCB/ABC. **B.** Analyse de survie globale à 5 ans de patients atteints de PMBL, LBDGC GCB et LBDGC ABC, montrant le meilleur pronostic du sous-type PMBL. **C.** Une partie de la signature spécifique PMBL est également surexprimée dans les lignées de lymphomes de Hodgkin. HL : *Hodgkin Lymphoma*.

## 2.2 TESTS DISPONIBLES POUR LA CLASSIFICATION MOLECULAIRE DES LBDGC

### 2.2.1 PUCES A ADN AFFYMETRIX

Le principe de ces puces est représenté ci-dessous (Figure 13). Des sondes complémentaires d'un fragment d'ADN cible sont synthétisées *in situ* sur un support pouvant contenir jusqu'à un million de sondes. Les ARN extraits de la tumeur sont transformés en ADN complémentaires qui vont être marqués par une biotine. Ces ADNc marqués sont mis en contact avec la puce permettant l'hybridation avec les sondes correspondantes. Un lavage permet d'éliminer les fragments d'ADNc non hybridés. La puce est scannée à très haute résolution, et un résultat numérique est associé à chaque spot d'intensité lumineuse. Une étape de normalisation est nécessaire afin de prendre en compte les variations techniques. Les puces à ADN ont de nombreuses autres applications que l'expression génique, incluant l'étude des SNP (*single nucleotide polymorphism*) et l'immunoprécipitation de la chromatine.

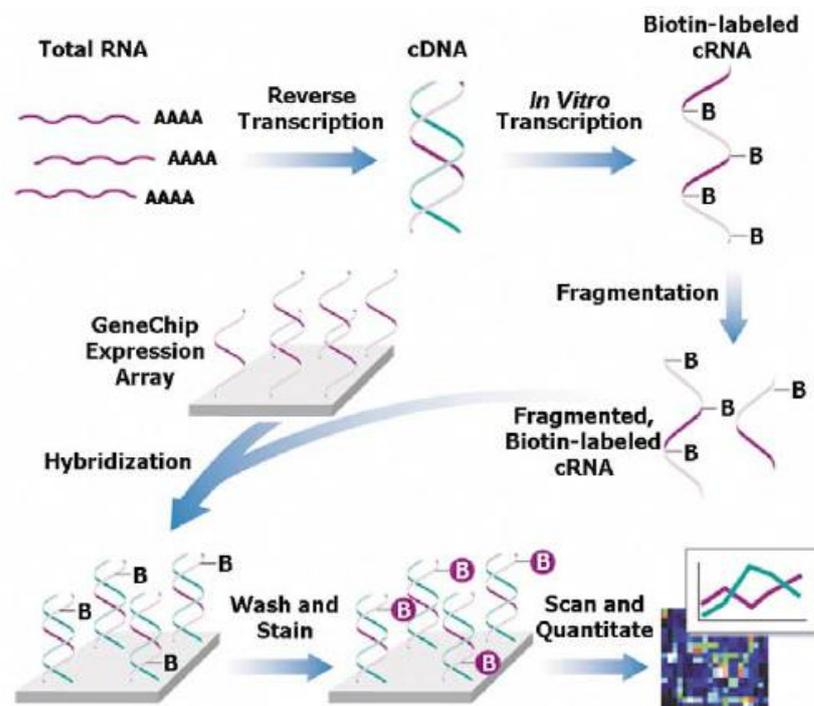


Figure 13 Principe des puces à ADN de type Affymetrix

D'après le site internet de *ThermoFisher*<sup>50</sup>. A partir de l'ARN tumoral, il y a hybridation de l'ADN complémentaire sur une surface contenant des milliers de séquences de gènes. Un résultat numérique est obtenu après avoir scanné la puce et normalisé les données.

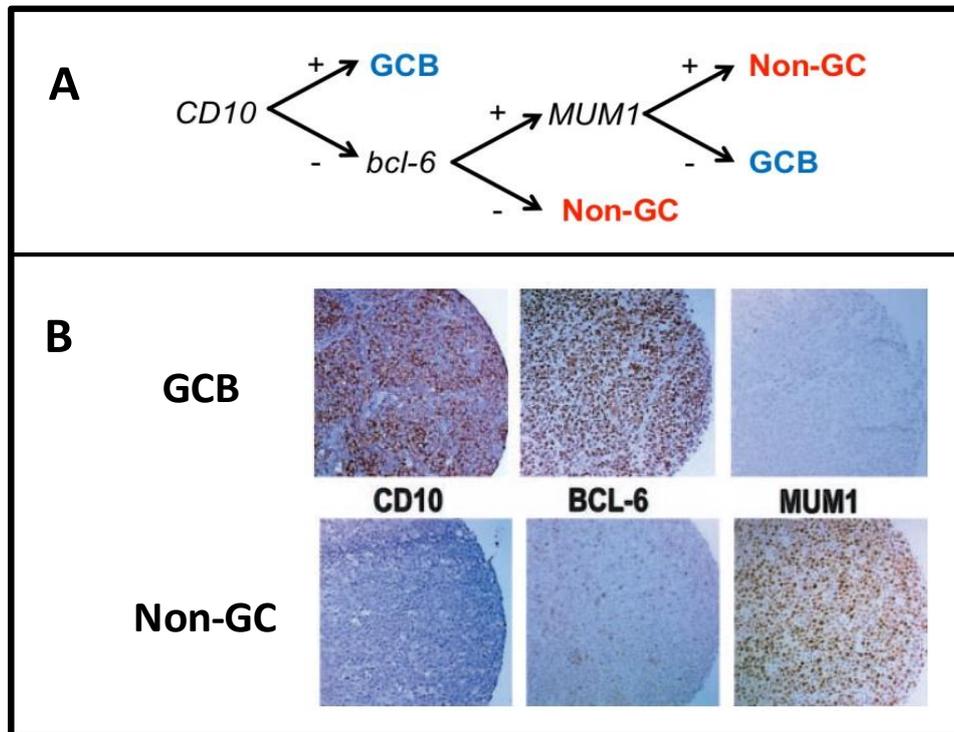
Les puces à ADN de type Affymetrix sont actuellement considérées comme le test de référence (*Gold Standard*), permettant la détermination des sous-types GCB, ABC et PMBL. Cependant, plusieurs éléments limitent leur utilisation. Le coût s'élève à plusieurs centaines d'euros par échantillon. Elles nécessitent du matériel particulier non disponible dans les laboratoires de biologie clinique, nécessitant un envoi et un délai important pour obtenir les résultats. De plus, il est nécessaire de travailler sur des prélèvements congelés, alors que la plupart des échantillons disponibles sont des prélèvements FFPE (*Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded*) conservés dans de la paraffine. Enfin, il n'existe pas de méthode de classification validée applicable au diagnostic.

### 2.2.2 ALGORITHMES D'IMMUNOHISTOCHEMIE

Dès 2004, Hans *et al.* ont transposé la classification moléculaire GCB/ABC en algorithme immunohistochimique<sup>51</sup>. Après analyse de 152 cas avec différents anticorps et comparaison avec les données de puces à ADN Lymphochip, ils ont proposé un algorithme combinant les expressions de CD10, bcl-6 et MUM1 (Figure 14) permettant de retrouver le sous-type GCB à 71% et les non-GCB (regroupant le sous-type ABC et le type 3 / *unclassified*) à 88%. La concordance globale entre puces à ADN et IHC atteint 79%. Cet outil a rapidement été adopté puisqu'il permet de disposer de données pronostiques dans un délai compatible avec la pratique clinique dans tous les laboratoires par une méthode simple et bon marché. De plus, les prélèvements conservés en paraffine FFPE peuvent être analysés. Il constitue encore actuellement le standard au diagnostic en l'absence de technique de profil d'expression génique utilisable.

La fiabilité de l'algorithme de Hans sera remise en question après d'autres études montrant des résultats variables et des problèmes de standardisation inter-laboratoires<sup>52</sup> notamment avec le marqueur bcl6. De plus, la différence de pronostic n'est pas retrouvée dans toutes les études, et n'est pas retrouvée après l'apparition du rituximab<sup>53</sup>. De nombreux autres algorithmes seront proposés par la suite visant à améliorer le taux de concordance et à retrouver la différence de pronostic entre les 2 groupes (Choi<sup>54</sup>, Muris<sup>55</sup>, Tally<sup>56</sup>, Visco-Young<sup>57</sup>...). Ainsi, un laboratoire d'anatomopathologie peut choisir la méthode qui lui convient le mieux en considérant la disponibilité des anticorps et l'habitude d'interprétation des marquages. Il faut noter que le seuil de positivité diffère entre les algorithmes et parfois au sein d'un même algorithme entre 30% et 80% (Choi), ajoutant à la difficulté de comparaison. La multiplicité de ces algorithmes démontre l'imperfection de cette méthode

et souligne les problèmes de reproductibilité, notamment la difficulté d'obtenir des marquages comparables avec des réactifs différents.



**Figure 14** Algorithme de Hans utilisé en immunohistochimie

Adapté d'après Hans *et al.*<sup>51</sup> **A.** Utilisation séquentielle de 3 anticorps pour classer les LBDGC en type GCB (*Germinal Centre B-cell like*) ou non-GC. **B.** Résultats de marquages immunohistochimiques d'un type GCB (CD10+, bcl-6+, MUM1- ; en haut) et d'un type non-GC (CD10-, bcl-6-, MUM1+ ; en bas) grossis 100 fois.

Parmi les études comparant les différents algorithmes, le travail de Gutierrez-Garcia *et al.* est particulièrement intéressant puisqu'il en compare 5 sur la même série de patients, pour laquelle les résultats de profil d'expression génique obtenus sur puces à ADN Affymetrix sont connus<sup>58</sup>. Les conclusions font état d'un nombre important de mal classés représentant jusqu'à 60% des GCB classés en non-GC (Choi) et jusqu'à 38% des ABC classés en GCB (Muris). Aucun des algorithmes d'IHC ne met en évidence une différence de survie, contrairement aux résultats des puces Affymetrix. D'autres études démontrent au contraire la robustesse de l'IHC, retrouvant une différence de classification avec les puces à ADN de seulement 8% à 13% selon les algorithmes utilisés et retrouvant une différence pronostique entre les groupes GCB et non-GC<sup>59</sup>. Dernièrement, la mise à jour 2016 de la classification OMS a précisé que la détermination des sous-types GCB/ABC par des techniques d'immunohistochimie était acceptable, bien qu'elle n'identifie pas le groupe

*unclassified* représentant 10 à 15% des patients, ait des problèmes de reproductibilité et que l'utilité pronostique ne soit pas retrouvée uniformément dans les études<sup>20</sup>.

### 2.2.3 NANOSTRING NCOUNTER TECHNOLOGIES

La technologie nCounter développée par Nanostring Technologies repose sur l'utilisation de 2 types de sondes différentes qui vont venir fixer directement chaque transcrite cible, s'affranchissant de l'étape de retro-transcription en ADNc. L'une des sondes porte une biotine permettant la fixation des transcrits hybridés au support, et l'autre comporte des fluorochromes qui vont permettre l'identification du transcrite. La succession de fluorochromes permet de créer environ 800 combinaisons différentes qui vont servir de codes-barres pour les différents transcrits après avoir été scannés par un microscope à fluorescence automatisé (Figure 15). Cette méthode s'affranchit de la retro-transcription et de l'amplification par PCR. Elle donne de bons résultats sur les prélèvements FFPE. En outre, le système est en grande partie automatisé et Nanostring revendique un temps de manipulation de trois fois 5 minutes sur 2 jours pour obtenir les résultats.

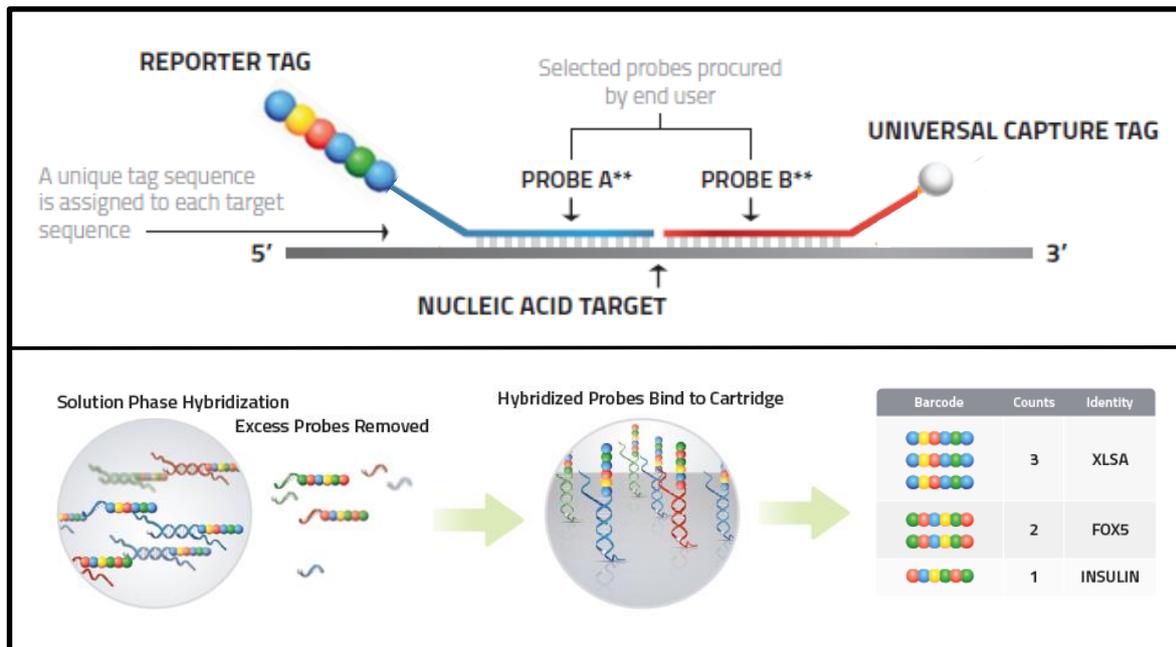
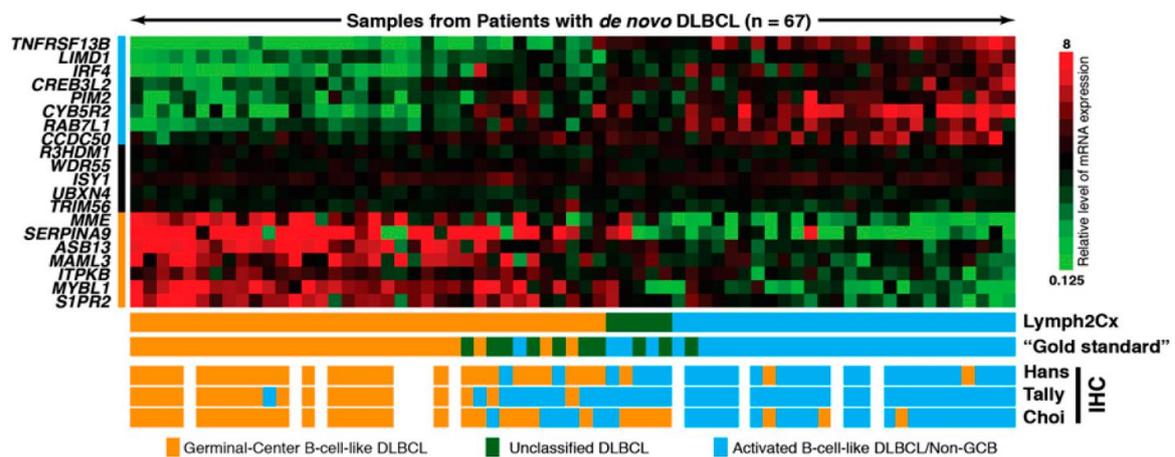


Figure 15 Principe de la technologie Nanostring nCounter

Adapté d'après le site internet Nanostring Technologies<sup>60</sup>. **En haut** : composition des 2 sondes utilisées pour fixer les transcrits ciblés, incluant une sonde contenant une succession de 6 fluorochromes qui servira de code-barres et une sonde biotinylée permettant la fixation au support. **En bas** : les sondes sont hybridées avec les ARN extraits de l'échantillon, la lecture des codes-barres permet un comptage direct du nombre de transcrits ciblés.

Le test de détermination des sous-types de LBDGC le plus connu utilisant cette technologie, publié en 2014, est appelé Lymph2Cx<sup>61</sup>. Il utilise 15 gènes discriminants entre les GCB et ABC, auxquels s'ajoutent 5 gènes de ménage. La méthode du prédicteur bayésien précédemment décrite est utilisée pour assigner un sous-type à chaque tumeur. Tous les prélèvements utilisés dans l'étude sont des prélèvements FFPE. Après entraînement du modèle sur une série de 51 tumeurs, la série de validation rapporte une concordance de 57 sur 58 tumeurs de type GCB ou ABC, excluant les *unclassified* (Figure 16). La reproductibilité est évaluée par l'analyse des échantillons dans 2 laboratoires différents et rapporte une concordance supérieure à 95%, démontrant la portabilité du test. Un article de 2015 renforcera les aspects analytiques du test en étudiant une cohorte de 344 patients traités par R-CHOP<sup>62</sup>, retrouvant les résultats attendus en terme de survie.



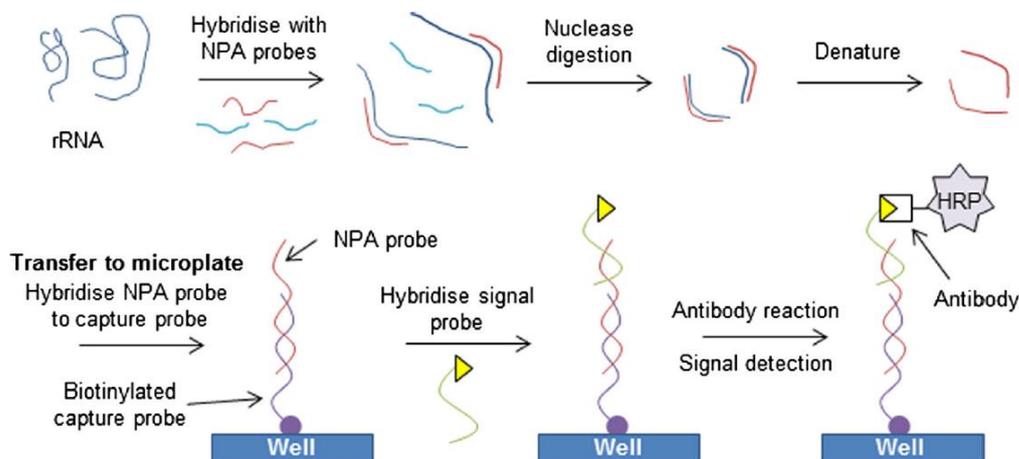
**Figure 16 Test Lymph2Cx, nCounter Nanostring : résultats de la cohorte de validation**

D'après Scott et al.<sup>61</sup>. Les résultats de profils d'expression génique pour les 67 patients de la série de validation sont représentés, triés par leur score. Les 20 gènes présents dans le modèle sont représentés à gauche : les 8 gènes du haut sont surexprimés dans les ABC, les 7 gènes du bas sont surexprimés dans les GCB, les 5 gènes de ménage sont au milieu. Par comparaison, les résultats des puces à ADN Affymetrix sont représentés ("Gold standard") ainsi que les résultats des algorithmes de Hans, Tally et Choi en IHC. En excluant les non-classés, une seule discordance est retrouvée entre le test Lympho2Cx et le Gold standard.

L'utilisation de la technologie nCounter se démocratise dans les essais cliniques, mais son utilisation au diagnostic n'est pas encore proposée. La nécessité d'acquérir du matériel dédié (250 000 euros environ) et le prix potentiel de l'analyse (1000 euros environ par analogie avec le test Prosigna® PAM50, test pronostique dans le cancer du sein) risquent de limiter son utilisation en pratique courante.

#### 2.2.4 TEST QUANTITATIF DE PROTECTION CONTRE UNE NUCLEASE

Ce test de qNPA (*quantitative Nuclease Protection Assay*) a été décrit en 2007 par Roberts *et al*<sup>63</sup>. et fait appel à l'expression des 14 gènes précédemment sélectionnés par Wright. Des sondes complémentaires des transcrits d'intérêt sont hybridées en présence des ARN du patient, formant des couples ARN/sondes. Une digestion par une Nucléase S1 permet d'éliminer les sondes et ARN non hybridés, laissant seulement les couples ARN/sondes dans le milieu (Figure 17). Une hydrolyse alcaline élimine les ARN hybridés, ne laissant dans le milieu que les sondes qui étaient préalablement hybridées aux ARN présents dans l'échantillon. Ces sondes sont transférées sur une microplaque. Une sonde marquée par une HRP (*horseradish peroxidase*) est ajoutée et un substrat lumineux est appliquée, permettant la quantification du signal après analyse d'image.



**Figure 17 Principe du qNPA (test de protection contre une nucléase)**

D'après Bruce *et al.*<sup>64</sup>. Les ARN sont mis à hybrider avec les sondes spécifiques des transcrits d'intérêt. La nucléase va dégrader les ARN et sondes non hybridés. Une dénaturation détruit l'ARN cible. La sonde correspondante au transcrite ciblé est fixé sur un support et une autre sonde comportant une peroxidase chimioluminescente est ajoutée, permettant une quantification après un signal lumineux.

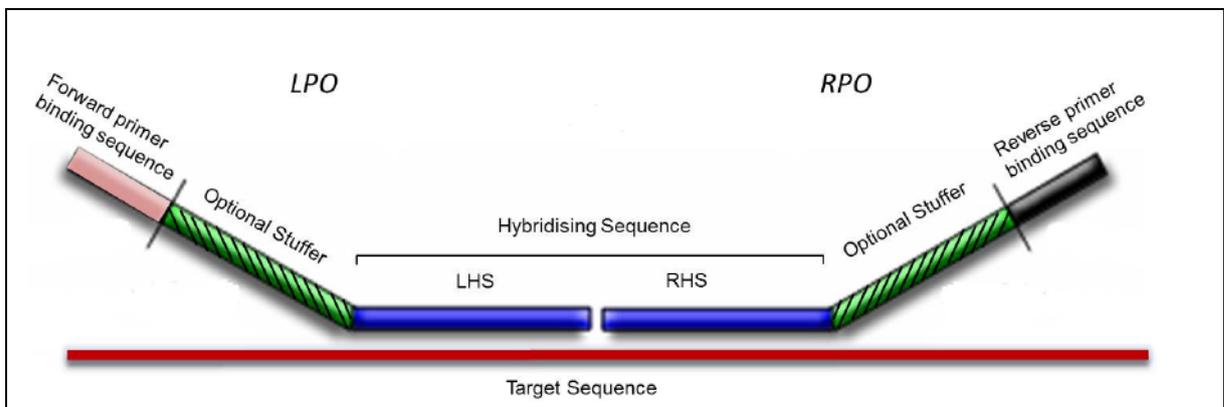
L'étude de 121 prélèvements FFPE issus de patients traités par R-CHOP a permis de retrouver une concordance avec les puces à ADN Affymetrix de 73% pour les GCB, 79% pour les ABC et 71% pour les *unclassified*. Cette technique, applicable aux prélèvements FFPE, reste complexe et nécessite du matériel d'imagerie spécifique et peu répandu.

D'autres techniques ont été décrites pour différencier les LBDGC de sous-type GCB et ABC, utilisant des approches de type PCR multiplexe quantitative<sup>65</sup> ou un test de quantification par nucléotides branchés<sup>66</sup>, avec des résultats encourageant sur des cohortes réduites. Ces travaux ne semblent pas avoir été poursuivis.

## 2.3 CLASSIFICATION GCB/ABC PAR UN TEST DE TYPE RT-MLPA

### 2.3.1 PRINCIPE DE LA MLPA

La MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) est une méthode de PCR multiplexe dépendante d'une étape de ligation, décrite en 2002 par Schouten *et al.*<sup>67</sup> Après avoir définie la séquence cible sur l'ADN génomique, deux sondes sont utilisées : l'une contient la première moitié de la séquence complémentaire à la séquence cible, la seconde contient la suite directe de la séquence complémentaire (Figure 18). Après une étape d'hybridation entre les sondes et l'ADN génomique, l'ajout d'une ligase permet l'assemblage des deux sondes en une sonde unique. Cette étape est spécifique des extrémités du site de ligation et ne permet aucun mésappariement. A l'extrémité de chaque sonde est ajoutée une séquence additionnelle universelle qui permet l'amplification par PCR des oligonucléotides ayant subi une ligation. Les oligonucléotides qui ne sont pas parfaitement hybridés à l'ADN cible ne sont pas amplifiés. Les amplicons sont détectés par analyse de fragments sur un séquenceur capillaire à l'aide d'un marqueur fluorescent présent sur une des deux amorces de PCR<sup>67</sup>.



**Figure 18 Composition des sondes utilisées en MLPA**

D'après MRC Holland : *Designing synthetic MLPA probes v15*<sup>68</sup>. Pour chaque séquence cible à amplifier, un couple de sondes est synthétisé : les séquences spécifiques s'hybrident à la séquence cible avant de subir une ligation qui va convertir les 2 demi-sondes en une sonde unique. A l'extrémité de chaque demi-sonde se trouve une séquence universelle qui va permettre l'amplification spécifique de la sonde. LPO : *Left Probe Oligonucleotides* ; RPO : *Right Probe Oligonucleotides* ; LHS : *Left Hybridising Sequence* ; RHS : *Right Hybridising Sequence* ; MLPA : *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*.

Des séquences *Stuffer* peuvent être insérées entre les séquences spécifiques et les séquences universelles afin d'ajuster la taille des différents amplicons de façon à obtenir une bonne résolution des pics : pour cela, un écart d'au moins 3 bases entre les amplicons est nécessaire.

### 2.3.2 APPLICATIONS DE LA MLPA

- ***Profils d'expression génique (GEP)***

Des profils d'expression génique peuvent être obtenus par RT-MLPA ; après une étape de rétrotranscriptase, le principe est le même que celui décrit ci-dessus. Une séquence issue de l'ADNc des transcrits étudiés sert de séquence cible. La hauteur de chaque pic reflète l'expression de chaque transcrit (Figure 19).

- ***Recherche de variants d'un seul nucléotide (SNV)***

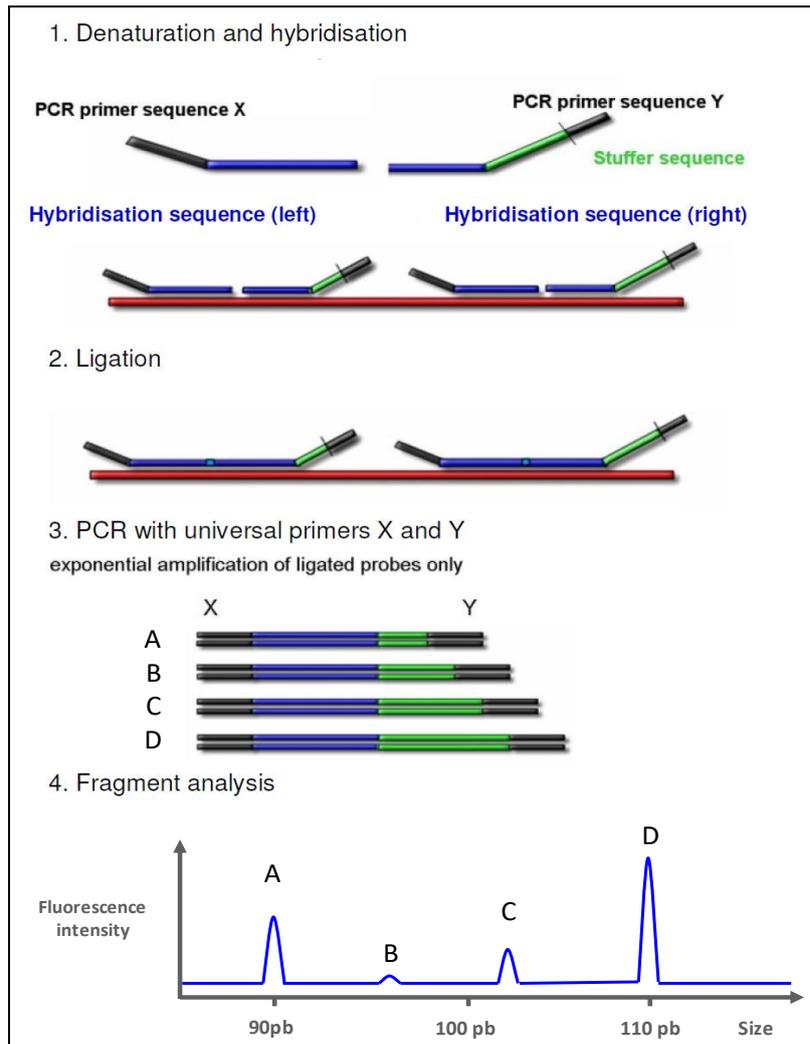
La recherche de SNV (*Single Nucleotide Variants*) est possible en concevant des sondes qui ont pour cible la séquence mutée du gène, et en plaçant la base mutée à l'extrémité 3' de la sonde 5'. La réaction de ligation assurée par la ligase est très sensible aux mésappariements à cet emplacement<sup>68</sup> et un amplicon est obtenu uniquement lorsque la mutation est présente (Figure 20). L'absence de pic sur le profil signe l'absence du variant dans l'échantillon.

- ***Recherche de réarrangements***

Les sondes doivent être complémentaires des réarrangements recherchés. Comme pour les mutations, la réaction de ligation, extrêmement spécifique, doit se faire au niveau du réarrangement et permettra l'obtention d'un signal uniquement si l'anomalie est présente.

- ***Variations du nombre de copies de gènes (CNV)***

Pour évaluer les CNV (*Copy Number Variations*), les séquences cibles sont issues de l'ADN génomique. Plusieurs gènes de référence doivent être intégrés dans le profil afin de normaliser les données. Le nombre de copies de chaque gène est obtenu après normalisation de la hauteur des pics par rapport à celle des gènes de référence et à la moyenne obtenue chez des échantillons témoins.



**Figure 19 Profil d'expression génique par RT-MLPA**

Adapté d'après MRC Holland : *Designing synthetic MLPA probes v15*<sup>68</sup>. Deux demi-sondes complémentaires à l'ADNc d'intérêt sont hybridées. Une ligase qui ne permet pas de mésappariement va suturer les deux demi-sondes en une sonde unique. Les différentes sondes suturées (A-D) sont amplifiées par PCR, les séquences obtenues sont de taille différente et vont être séparées et quantifiées par analyse de fragments.



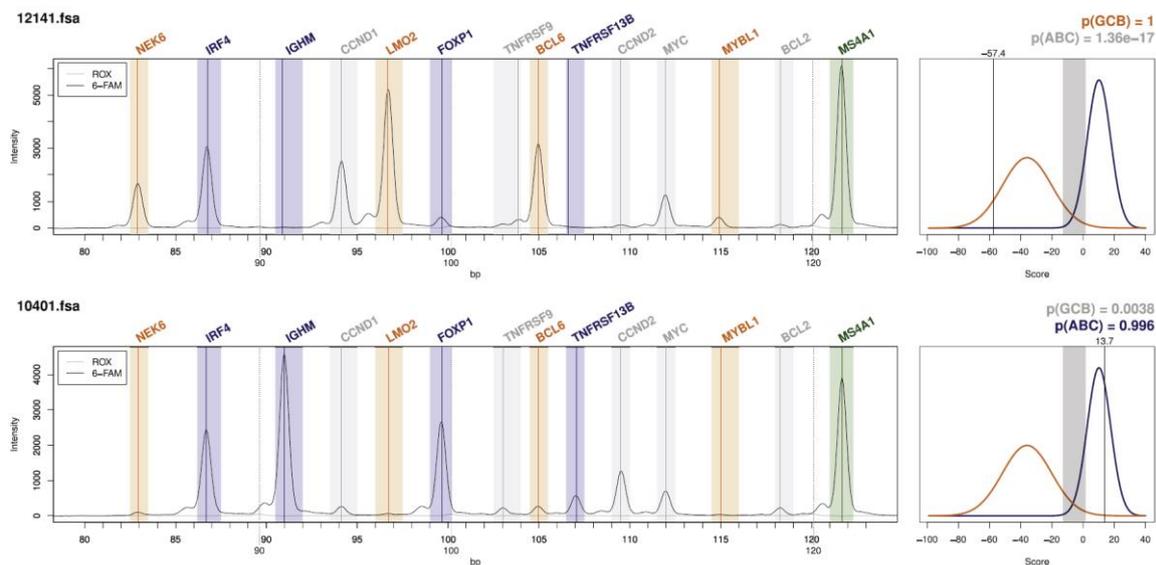
**Figure 20 Recherche de SNV par MLPA**

**Gauche** : le nucléotide muté est reconnu par la sonde spécifique permettant un appariement complet des 2 séquences. La mutation se trouve sur le site de ligation, la ligase permet de lier les 2 sondes en une seule qui sera amplifiée. **Droite** : la séquence sauvage ne permet pas un appariement parfait. La réaction de ligation n'aura pas lieu car le mésappariement se trouve sur le site de ligation.

La MLPA présente de nombreux avantages. Elle permet une amplification et quantification de plusieurs séquences en une seule étape. C'est une méthode simple, rapide et bon marché, ne nécessitant qu'un thermocycleur et un analyseur de fragments. En particulier, la taille courte des sondes permet l'hybridation de fragments d'ADNc partiellement dégradés, rendant l'utilisation de cette technique possible à des prélèvements FFPE. Elle est commercialisée par la société MRC Holland sous forme de kits commerciaux avec des mix d'oligonucléotides définis, mais est aussi utilisée sous forme de techniques maison avec des mix de séquences cibles établis par différents laboratoires de recherche ou de diagnostic.

### 2.3.3 TEST DEVELOPPE AU CENTRE HENRI BECQUEREL

Préliminairement à ce travail, l'équipe de l'U918 a publié en 2015 une méthode permettant la classification des sous-types GCB / ABC par un test utilisant la technique RT-MLPA<sup>69</sup>. Ce test simple, rapide et peu onéreux se base sur la mesure de l'expression de 14 transcrits impliqués dans différentes voies de signalisation. Huit transcrits, surexprimés dans l'un ou l'autre des sous-types, sont utilisés pour attribuer une probabilité d'appartenir au groupe GCB ou ABC (Figure 21).



**Figure 21 Profils d'expression génique obtenus par RT-MLPA**

D'après Mareschal et al<sup>69</sup>. Les profils de 2 échantillons sont représentés : LBDGC de type GCB en haut, LBDGC de type ABC en bas. Les pics correspondants aux différents transcrits sont recherchés dans les zones surlignées (bleu pour les transcrits surexprimés dans les ABC, orange pour les transcrits surexprimés dans les GCB, vert pour le contrôle interne MS4A1 codant pour le CD20, gris pour les autres transcrits). Les prédictions données par le modèle sont représentés à droite. La distribution théorique des scores pour les sous-types GCB et ABC est également visible.

Les résultats du test sur une série de validation de 64 patients permettent de classer 84,4% des échantillons dans le sous-type attendu déterminé par puces Affymetrix. Ce test est cité dans la mise à jour 2016 de la classification OMS comme une méthode de profil d'expression génique prometteuse pouvant être utilisée pour la classification GCB / ABC des LBDGC.

#### 2.4 OBJECTIFS DE L'ETUDE

La preuve de concept de ce premier test démontre la faisabilité des profils d'expression génique en pratique courante avec des résultats équivalents aux méthodes commerciales comme l'approche Nanostring nCounter.

Le développement continu des thérapies ciblées devrait à terme imposer des différences de traitement en fonction des sous-types GCB, ABC mais aussi PMBL qui voient le développement des SINE. De plus, l'existence de PMBL "moléculaires" sans atteinte médiastinale et de rares problèmes diagnostiques rendent nécessaires pour ces tumeurs une approche de profil d'expression génique pour mieux classer les patients afin qu'ils bénéficient d'une stratégie thérapeutique optimale. Dans cette optique et dans la continuité du premier test GCB / ABC, nous avons travaillé à inclure le sous-type PMBL dans ce classifieur, tout en améliorant la classification des sous-types GCB et ABC. Pour cela, il a fallu créer un modèle applicable au classement de 3 sous-types différents, rendant obsolète la dichotomie du prédicteur bayésien utilisé depuis Wright et al. en 2003. Pour se conformer à la mise à jour 2016 de la classification OMS, le nouveau test inclut également le marqueur *EBER* permettant la détection des LBDGC EBV+. Enfin, le test permet la détection simultanée de la mutation *MYD88 L265P*, emblématique du sous-type ABC, qui pourrait être utilisée comme critère d'inclusion ou d'exclusion dans des essais cliniques.

L'article suivant a été accepté pour publication dans la revue *Journal of Molecular Diagnostics*.

### 3 ARTICLE EN ANGLAIS

## Determination of molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma using a reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification classifier: A CALYM study

Victor Bobée\*<sup>1,2</sup>, Philippe Ruminy\*<sup>1</sup>, Vinciane Marchand<sup>1</sup>, Pierre-Julien Vially<sup>1,3</sup>, Ahmad Abdel Sater<sup>1,3</sup>, Liana Veresezan<sup>4</sup>, Fanny Drieux<sup>1,4</sup>, Caroline Bérard<sup>3</sup>, Elodie Bohers<sup>1</sup>, Sylvain Mareschal<sup>1</sup>, Sydney Dubois<sup>1</sup>, Jean-Philippe Jais<sup>5</sup>, Karen Leroy<sup>6</sup>, Martin Figeac<sup>7</sup>, Jean-Michel Picquenot<sup>1,4</sup>, Thierry Jo Molina<sup>8</sup>, Gilles Salles<sup>9</sup>, Corinne Haioun<sup>10</sup>, Hervé Tilly<sup>1</sup>, Fabrice Jardin<sup>1</sup>

\*V.B. and P.R. contributed equally to this work

<sup>1</sup> University of Normandie, UNIROUEN, Inserm U 1245, Centre Henri Becquerel, F 76 000 Rouen, France

<sup>2</sup> Rouen University Hospital, Department of Biological Hematology, F 76 000 Rouen, France

<sup>3</sup> University of Normandie, UNIROUEN, LITIS EA 4108, F 76 000 Rouen, France

<sup>4</sup> Department of Pathology, Centre Henri Becquerel, F 76 000 Rouen, France

<sup>5</sup> Inserm UMRS 872, AP-HP Necker Hospital, Paris, France

<sup>6</sup> Inserm U 955 Team 09, AP-HP Henri Mondor Hospital, Creteil, France

<sup>7</sup> University of Lille, Plate-forme de génomique fonctionnelle, Centre de Biologie et Pathologie, F-59037 Lille cedex, France

<sup>8</sup> Department of Pathology, Necker Hospital, AP-HP, Université Paris Descartes Sorbonne Cité, Paris, France

<sup>9</sup> Department of Hematology, University Claude Bernard Lyon 1, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Benite, France.

<sup>10</sup> Hospital Henri Mondor, Lymphoid Malignancies Unit, Creteil, France.

**Running title:** RT-MLPA CLASSIFIER FOR DLBCL SUBTYPES

**Funding:** This work was supported by grants from the French National Cancer Institute (INCA), the ‘Ligue contre le Cancer (comité Seine Maritime)’, the ‘Agir avec Becquerel’ Association, the GEFLUC Association and the CALYM Consortium.

**Disclosures:** None.

## **Abstract**

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common non-Hodgkin lymphoma that includes three major subtypes termed germinal center B-cell-like (GCB), activated B-cell-like (ABC) and primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL). With the emergence of novel targeted therapies, accurate methods capable of interrogating this cell-of-origin classification should soon become essential in the clinics. To address this issue, we developed a novel gene expression profiling DLBCL classifier based on reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification (RT-MLPA). This assay simultaneously evaluates the expression of 21 markers, to differentiate PMBL, ABC, GCB and EBV positive DLBCLs. It was trained using 70 paraffin-embedded biopsies and validated using more than 160 independent samples. Compared with a reference classification established from Affymetrix U133+2 data, RT-MLPA classified 85.0% samples into the expected subtype, comparing favorably with current diagnostic methods. This assay also proved to be highly efficient in detecting the *MYD88* L265P mutation, even in archival paraffin-embedded tissues. This reliable, rapid and cost-effective assay utilizes common instruments and reagents and could thus easily be implemented into routine diagnosis workflows, to improve the management of these aggressive tumors.

## **Keywords**

Lymphomas, Gene expression, Classifications, Diagnostic Hematology

## Introduction

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common non-Hodgkin lymphoma, accounting for nearly 40% of cases<sup>1</sup>. It is a heterogeneous disease that includes aggressive tumors of different mature B-cell origins. Two molecular subtypes have been identified by gene expression profiling (GEP)<sup>2-4</sup>. The first, termed germinal center B-cell-like (GCB), is associated with a gene expression signature of normal germinal center B cells. Its prognosis is usually favorable, with a 5-year overall survival rate (OS) of almost 75%. The second, termed activated B-cell-like (ABC), develops from late GC B cells or plasmablasts. These lymphomas are more aggressive, and only 30% of patients can be cured using current therapy regimens<sup>5</sup>.

This ABC vs GCB cell-of-origin (COO) classification of DLBCLs is now recognized in the WHO classification<sup>6</sup> and should soon have an important impact in the clinics. For example, because ABC DLBCL cell survival strongly depends on B-cell receptor signaling, specific inhibitors of the NF- $\kappa$ B pathway such as ibrutinib appear as promising alternatives to the current immune-chemotherapy-based regimens. Similarly, inhibitors of the EZH2, BCL2, and BCL6 oncoproteins have shown encouraging results in GCB DLBCL. Accurate diagnostic methods capable of discriminating these subtypes are thus needed. Unfortunately, conventional histology is not informative, array-based gene expression profiling (GEP), considered the gold standard, is poorly adapted to daily diagnostic work, and the immunohistochemistry (IHC)-based algorithms used in most institutions suffer from a poor degree of reproducibility<sup>7-8</sup>. New dedicated GEP methods have thus emerged that show good sensitivity, specificity and reproducibility, even when applied to formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) biopsies<sup>9-10</sup>.

An important limit of these methods is that they only inform on the GCB and ABC GEP signatures and do not recapitulate the true heterogeneity of these lymphomas. For example a third important subtype of DLBCL, termed primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL), results from the transformation of thymic B cells. It usually arises in the mediastinum, in younger patients with a female predominance<sup>11,12</sup>, but recent evidence indicate that it can develop solely at non-mediastinal sites, making its diagnosis challenging<sup>13</sup>. Also, the recognition of EBV positive DLBCLs as a definitive entity<sup>8</sup> add further layers of complexity to the diagnosis of these aggressive tumors.

We have recently described a rapid and inexpensive RT-MLPA assay that allows for an accurate classification of GCB and ABC DLBCL<sup>14</sup>. In the present study, we extended this assay to the identification of PMBL, the assessment of the EBV infection status, the detection of the ABC hallmark *MYD88* L265P mutation and the expression of multiple other prognostic factors and important therapeutic targets.

## **Material and Methods**

### **Patients**

A total of 218 biopsy samples were used in this study (Supplementary Table S1). From the GHEDI study program, fresh/frozen biopsies of 150 DLBCL cases had previously been analyzed using U133+2 GEP arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA). The HGU133+2.0 Affymetrix GeneChip microarray dataset has been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and is accessible through GEO series accession number GSE87371. A total of 38 PMBL cases from the LNH07-3B trial (n=9) and from the Centre Henri Becquerel, Rouen, France (n=29), were also included as well as 30 DLBCL cases from the Centre Henri Becquerel. The diagnoses were established according to the World Health Organization 2008 criteria by expert pathologists.

### **RNA extraction**

For the 150 cases from the GHEDI study and the 9 patients from the LNH07-3B trial, RNA samples were extracted from FFPE tissue using Siemens TPS and Versant reagents kit (Siemens Healthcare Diagnostics). For PMBL from the Centre Henri Becquerel, RNA was extracted from FFPE tissue for 22 patients using the Maxwell 16 system from Promega (Mannheim, Germany) and from frozen lymph node biopsies for 7 patients. RNA from other DLBCLs was extracted from frozen lymph node biopsies when available (n=26) and from FFPE tissue using the Maxwell 16 system (n=4).

### **Immunohistochemistry and EBV infection status evaluation**

For the samples of the GHEDI cohort, the cell of origin classification was addressed by immunochemistry using the Hans algorithm, by evaluating CD10, BCL6, and MUM1 expression<sup>15,16</sup>. Briefly, paraffin-embedded 3- $\mu$ m-thick sections were subjected to antigen retrieval and antibody staining. The immunoperoxidase stains were performed on a Benchmark Ultra automated stainer (Roche Ventana, Tucson, AZ) using Ultraview Universal diaminobenzidine detection kits. In the absence of an internal positive control, immunostains were considered non-evaluable.

Chromogenic *in situ* hybridization for EBER (EBER-ISH) was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, sectioned at 4  $\mu$ m and placed on positively charged slides. Slides with specimens, as well as appropriate positive controls, were then placed in a 60°C oven for 1 hour and loaded onto the Ventana Benchmark XT for subsequent deparaffinization, cell conditioning, enzymatic digestion (Protease 3, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), and *in situ* staining. The INFORM EBER Probe (Ref800-2842, Ventana Medical Systems), used in combination with an anti-DNP-biotin/streptavidin chromogen, was dispensed on the slides and incubated for 60 minutes. The iView Blue Detection Kit (Ventana Medical Systems) was used to produce the chromogenic reaction. Slides were counterstained using Ventana Medical Systems Red Stain II. After removal from the Benchmark XT, slides were manually dehydrated through graded ethanol solutions and xylene and then coverslipped using a nonaqueous mounting media.

### **Mutational analysis**

Samples from the GHEDI study have been analyzed in a previous study by a dedicated next-generation sequencing Lymphopanel, designed to identify mutations in 34 genes that are important for lymphomagenesis using an Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM)<sup>17</sup>. All *MYD88* L265P mutations were confirmed by Sanger sequencing.

### **RT-MLPA Probes and Reaction Mix**

The sequences of the RT-MLPA probes are provided in Table 1 (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany). To avoid unwanted amplification of genomic DNA, all gene-specific pairs were designed across exon-exon boundaries. All comprised a gene-specific region complementary to the cDNA target and a primer for final PCR amplification. Two probes surrounding the *MYD88* L265P mutation were also designed, with the last nucleotide of the 5' probe corresponding to the T>C substitution. Finally, two probes were designed to address the expression of the EBER1 transcript.

All 5' probes have a GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA tail at their 5' ends and all 3' probes a TCCAACCCTTAGGGAACCC tail at their 3' ends to allow for the final PCR amplification. Spacers of variable lengths were inserted between these primers and the target-specific sequences to allow for distinguishing the different PCR products according to their sizes. All 3' probes were phosphorylated at their 5' ends to allow the ligation reactions. Competitors identical to one of the probe but without the primers were added to the RT-MLPA probe mix to normalize the amplification signals.

The RT-MLPA probe mix was prepared from 10  $\mu$ M dilutions of probes and competitors in 10 mM Tris, 1 mM EDTA buffer. The six competitors were first mixed with their corresponding probes at a 1 to 8 probe to competitor ratio for *IGHM*, 1 to 6 for *IRF4*, 1 to 4 for *FOXP1*, 1 to 3 for *NEK6* and 1 to 2 for *LMO2* and *MS4A1* to normalize the levels of expression. A fixed volume (2  $\mu$ l) of each probe (n=36) or probe + competitor (n=6) dilutions was next mixed to obtain a final volume of 84  $\mu$ l. An equal volume of 20 mM Tris, 2 mM EDTA solution was then added to obtain a volume of 168  $\mu$ l. The working solution was obtained by diluting 8.4  $\mu$ l of this concentrated probe mix in 1 ml of 10 mM Tris, 1 mM EDTA solution.

### **RT-MLPA assay and data processing**

The protocol and data processing were as previously described<sup>14</sup>, using MLPA reagents from MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands). Briefly, 2  $\mu$ l of total RNA from DLBCL biopsies, corresponding to 8-500 ng, was added to 3.75  $\mu$ l of reverse transcription mix containing random hexamer primers. The samples were heated for 1 minute at 80°C to melt the secondary structure, incubated for 5 minutes at 37°C to allow the hybridization of the random primers, and cooled at 4°C. Next, 0.5  $\mu$ l of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase was added, and the samples were incubated for 15 minutes at 37°C for cDNA synthesis, heated for 2 minutes at 98°C and cooled at 4°C. Then, 3  $\mu$ l of RT-MLPA probe mix was added (1.5  $\mu$ l of SALSA-MLPA buffer and 1.5  $\mu$ l of final dilution probe mix) before denaturation at 95°C for 2 min and hybridization at 60°C for 1 hour. Ligation of the annealed oligonucleotides was performed at 54°C for 15 min, adding 32  $\mu$ l of ligation mix, and heated for 5 min at 98°C. Next, 2.5  $\mu$ l of the ligation mixture was added to 7.5  $\mu$ l of Salsa PCR master mix containing the labeled forward primer and the unlabeled reverse primer. PCR amplification involved 35 cycles of 94°C for 30s, 58°C for 30s and 72°C for 30s, followed by 72°C for 4 min. The resulting MLPA amplicons were analyzed by fragment analysis using an ABI 3130 XL capillary electrophoresis system (Applied Biosystems, USA). For fragment analysis, 0.5  $\mu$ l of PCR amplicon was mixed with 19  $\mu$ l of Hi-di Formamide and 0.5  $\mu$ l Genescan-400 HD ROX size standard (Applied Biosystems). The mixture was incubated for 3 minutes at 95°C and analyzed.

## **Statistical analysis**

Samples were classified using a linear predictor score and a Bayesian predictor, assuming that the distribution of the scores within the different groups was normal, allowing the estimation of the probability for each case of belonging to one or the three DLBCL subtypes. Scaling factors were applied to balance the overweighting of the most highly expressed genes. To account for these differences in expression ranges, the t statistic that was used for the gene-specific coefficients was further divided by the mean expression of the corresponding genes in the training series. This interpretation of the results was made using dedicated software (<https://bioinfo.calym.org/RTMLPA/>, registration required, last accessed June 27, 2017) that handles the entire analysis process, with a 90% confidence threshold to classify a sample. The Wilcoxon rank sum test was used to compare the expression of the different markers in the different subtypes.

**Table 1 Sequences of RT-MLPA probes and competitors**

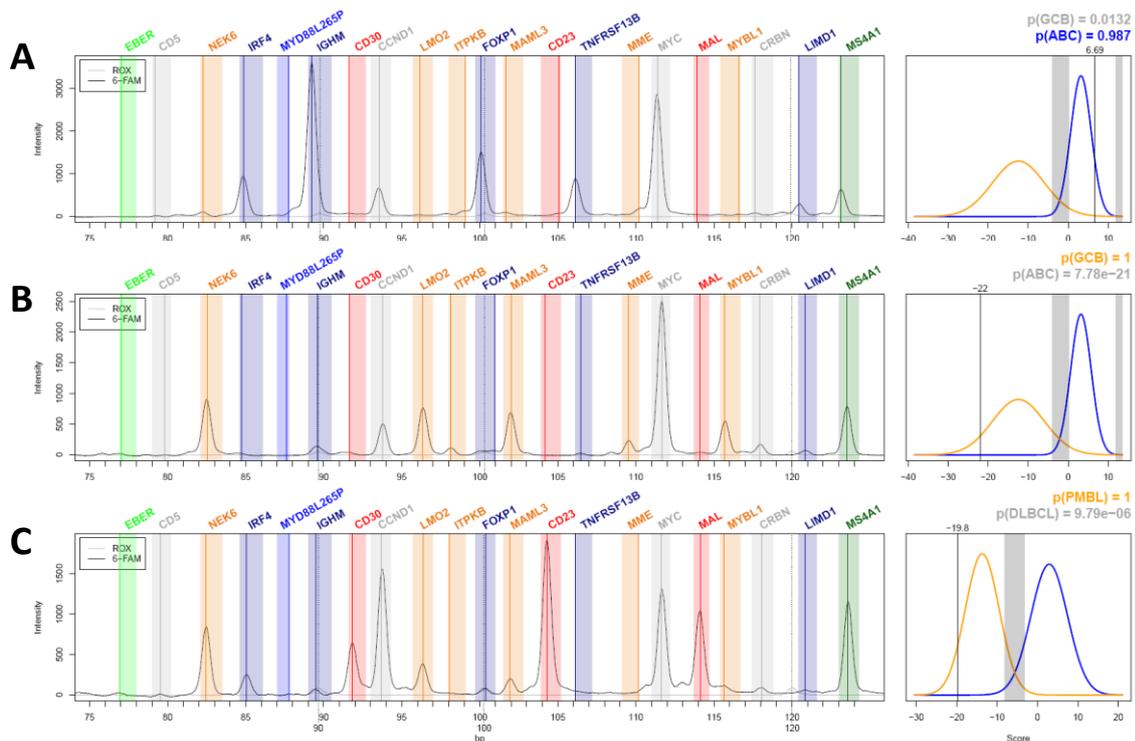
All sequences of the RT-MLPA probes and the oligonucleotides used as competitors are provided. The sequences of the primers used for PCR amplification are underlined.

5' Probes	EBER1L3	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> AGTAGCCACCCGTCCC GGTA-3'
	CD5E3L	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> ACCACCACA ACTCCAGAGCCCACAG-3'
	NEK6E2F	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> ACCTGTGCATCCTCCTGACCCACAG-3'
	IRF4E6F2	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> ACTGCCGAAGCCTTGCGCTTCTCAG-3'
	MYDmF	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> ACAGGTGCCCATCAGAAGCGACC-3'
	IGHME2F2	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> AGCGTCTCCATGTGTGCCCCG-3'
	CD30E3L2	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> ATTGTACAGCCTGCGTGACTTGTCTCGAG-3'
	CCND1E3F	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> A TACCTTCGTTGCCCTCTGTGCCACAG-3'
	LMO2E5F	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> ACGGAAGCTCTGCCGGAGAGACTATCTCAG-3'
	ITPKBE2F	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> A TACTACGGATCCAGCTGGCAGGACACGCAG-3'
	FOXP1E10F3	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> ATCCCTTCCCCTTCAACCTCTTGCTCAAG-3'
	MAML3E2F	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> A TACTCTTACGCTGCACTTCCATCCCACGGTCAG-3'
	FCER2E7F3	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> A TATAGCTAAGGATGGAGTTGCAGGTGTCCAGCG-3'
	TNFRSF13BF2	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> A TACTACTACTAGCGCACCTGTGCAGCCTTCTGCA-3'
	MMEE10F	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> A TACTACTTACAAGGAGTCCAGAAATGCTTTCGCAAG-3'
	MYCE1F	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> A TACTACTACTTCGGGTAGTGAAAACCAGCAGCCTC-3'
	MALE3F	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> A TACTACTACTACTACGGTGAGAGACTTCTGGGTACCTTG-3'
	MYBL1E10F2	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> A TCCAGAAATTTGCAGAGACTCTAGA AACTATTGAATCT-3'
	CRBNE9F	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> A TACTACTACTGCCTTCTACAGAACACAGCTGGTTTCTGG-3'
	LIMD1E4F	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> A TACTACTACTCTTTCTTTGTGGACATCTGATCATGGACATG-3'
MS4A1E5F2	5'- <u>GTGCCAGCAAGATCCAATCTAG</u> A TACTACTACTCTTTCTTATGAGGGAATCTAAGACTTTGGGG-3'	
3' Probes	EBER1R2	5'-Pho-CAAGTCCC GGGTGGT GAGGATATCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	CD5E4R	5'-Pho-CTCCTCCAGGCTGCAGCTGGTCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	NEK6E3R	5'-Pho-AGGCATCCCAACAGCTGTCTTTTCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	IRF4E7R	5'-Pho-ACTGCCGGCTGCACATCTGCCTGTA TCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	MYDmR	5'-Pho-GATCCCCATCAAGTACAAGGCAATGAAGAA TCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	IGHME3R	5'-Pho-ATCAAGACACAGCCATCCGGGCTTCTACTATCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	CD30E4R	5'-Pho-ACGACCTCGTGGAGAAGACGCCGTA CTCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	CCND1E4R	5'-Pho-ATGTGAAGTTCATTTCCAATCCGCCTTACTTCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	LMO2E6R	5'-Pho-GCTTTTTGGGCAAGACGGTCTGTGCTACTATCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	ITPKBE3R	5'-Pho-GGAGTTTCAAGGACAGCTGCCAATGGCATACTATCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	FOXP1E11R	5'-Pho-GCATGATTC AACAGA AACTGCAGCAGCTACTACTATCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	MAML3E3R	5'-Pho-GAGCAGCATCCAGTTGGACTTCCCGAATACTTCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	FCER2E8R	5'-Pho-GCTTTGTGTGCAACACGTGCCCTGAAAAGTTACTTCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	TNFRSF13BE3R	5'-Pho-GGTCACTCAGCTGCCGCAAGGAGCTACTACTACTATCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	MMEE11R	5'-Pho-GCCCTTTATGGTACAACCTCAGAAACAGCATACTACTCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	MYCE2R	5'-Pho-CCGCGACGATGCCCTCAACGTTACTACTACTACTATCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	MALE4R	5'-Pho-GACGACGCTACCACTGCACCGTACTACTACTACTATCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	MYBL1E11R	5'-Pho-GATCCTGTAGCATGGAGTGACGTTACCAGTTTTTACTACTTCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	CRBNE10R	5'-Pho-GTATGCCTGGACTGTTGCCAGTGTAAGATTACTACTACTATCCAACCTTAGGGAACCC-3'
	LIMD1E5R	5'-Pho-ATCCTGCAAGCCTGGGGAAGTCTACCTACTACTACTACTATCCAACCTTAGGGAACCC-3'
MS4A1E6R	5'-Pho-GCTGTCCAGATTATGAATGGGCTTCTCCACTACTACTACTATCCAACCTTAGGGAACCC-3'	
Competitors	IRF4compF	5'-CTGCCGAAGCCTTGCGCTTCTCAG-3'
	IgMCompF	5'-GCGTCCTCCATGTGTGCCCCG-3'
	LMO2compF	5'-CGGAAGCTCTGCCGAGAGACTATCTCAG-3'
	Foxp1compF	5'-CCCTTCCCCTTCAACCTCTTGCTCAAG-3'
	MS4A1compF	5'-TTCTTCATGAGGGAATCTAAGACTTTGGGG-3'
	NEK6compR	5'-TCCAACCTTAGGGAACCC-3'

## Results

### Gene selection

Twenty-one genetic markers were included in the RT-MLPA assay. Eleven genes were selected from the literature to discriminate ABC from GCB cases (ITPKB, LMO2, MAML3, MME, MYBL1, NEK6 for GCB; and IRF4, FOXP1, IGHM, TNFRSF13B, LMD1 for ABC) and three to identify PMBLs (FCER2 encoding CD23, TNFRSF8 encoding CD30 and MAL)1-4,18-20. The EBER1 mRNA (EBV-encoded small nuclear early region) was included to assess the EBV infection status. Five additional markers were included: CCND1 overexpressed in mantle cell lymphoma, CRBN targeted by the immunomodulatory drugs lenalidomide and pomalidomide<sup>21</sup>, MYC and CD5 whose expression is associated with a poor outcome and MS4A1 encoding the CD20 receptor. Finally, two RT-MLPA probes were designed to examine the MYD88 L265P hot-spot mutation status (Supplemental Figure S1). Representative RT-MLPA profiles of ABC, GCB and PMBL cases are presented in Figure 1.



**Figure 1 Representative RT-MLPA profiles**

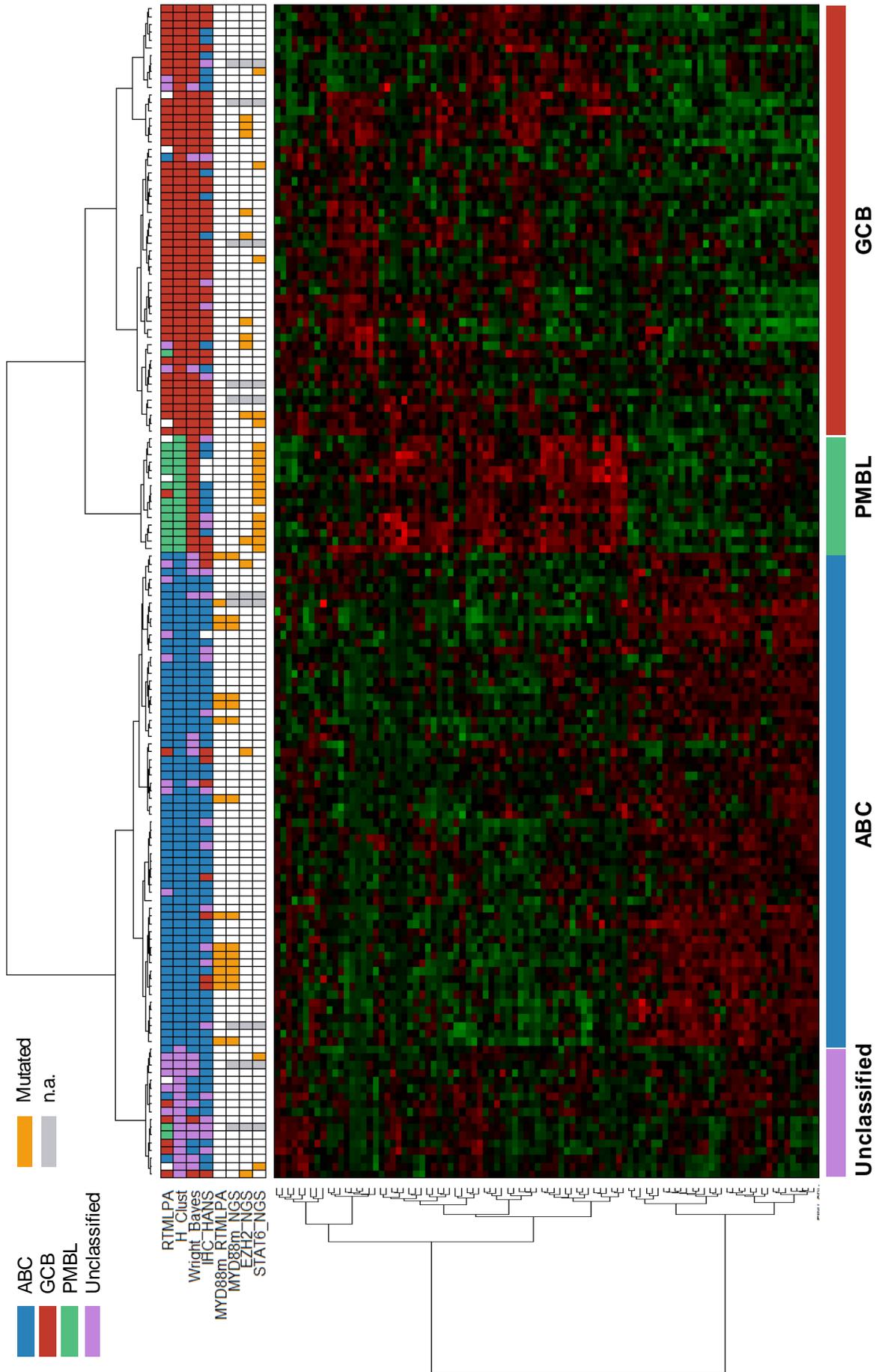
RT-MLPA profiles of three representative ABC (A), GCB (B) and PMBL (C) samples. The left panel shows the fragment-analysis profile (intensity of fluorescence as a function of the PCR fragment sizes), with intervals scanned for gene-related peaks highlighted by various colors [blue for ABC-related genes, orange for GCB-related genes, red for PMBL-related genes, green for EBV+DLBCL specific EBER gene, dark green for the MS4A1 (encoding CD20) internal control, and gray for other genes]. Size markers, used for alignment of profiles and fragment size estimation (ROX channel), are displayed with dotted lines, indicating their theoretical size. The right panel illustrates the cell of origin prediction retrieved by the Bayesian predictor.

### **RT-MLPA robustness**

The RT-MLPA assay was applied to 150 RNA samples extracted from archival paraffin-embedded biopsies from the GHEDI study. Fourteen biopsies had been treated with an AFA fixative, 4 with a Bouin fixative, and 91 with formaldehyde. No information was available for the remaining cases obtained from different institutions. The median RNA concentration was 21 ng/μl (range 4-94 ng/μl). Interpretable profiles were obtained for 143/150 cases (95.3%), including 13/14 AFA- and 3/4 Bouin-fixed samples (Supplemental Figure S2, S3, S4 and S5), confirming the robustness of the RT-MLPA procedure despite the heterogeneity of the fixatives.

### **Class Prediction**

The reference COO classification was established by unsupervised hierarchical analysis (complete distance, Ward agglomeration) using HGU133+2.0 Affymetrix GeneChip arrays expression data obtained from frozen biopsies from the 150 cases of the GHEDI study (GEO, GSE87371). For this analysis, 56 GCB/ABC and 39 DLBCL/PMBL discriminant genes were selected from the literature (Supplemental Table 1)<sup>3,4,9</sup>. Three clusters were delineated, allowing the identification of 63 ABC, 55 GCB and 15 molecular PMBL (m-PMBL) cases (42%, 37% and 10% of cases, respectively)(Figure 2). Seventeen samples (11%) could not be classified into any recognizable cluster and were considered unclassified. For validation, the same gene expression dataset was analyzed using the Wright's algorithm as previously described<sup>3</sup>. Excluding the 15 PMBL cases, which, as expected, were classified within the GCB subtype, the two methods reached an agreement of 85.2%, confirming the validity of the hierarchical clustering analysis. Also, next-generation sequencing (NGS) data indicated that 13 of the 15 PMBL cases identified by hierarchical clustering presented a mutation of the *STAT6* gene, particularly enriched in this lymphoma subtype<sup>22</sup>.



### Figure 2 Molecular classification of the GHEDI series determined by unsupervised hierarchical clustering

Unsupervised hierarchical clustering of 150 patients from the GHEDI series, obtained from the Affymetrix gene expression data of 95 ABC, GCB and PMBL discriminant genes. The results from the RT-MLPA classifier (RTMLPA), hierarchical clustering (H-Clust), the Wright's predictor (Wright Bayes) and the Hans algorithm (IHC Hans) are provided. MYD88 L265P mutational status determined by RT-MLPA (MYD88m\_RTMLPA) and next-generation sequencing (MYD88\_NGS) as well as EZH2 (EZH2\_NGS) and STAT6 (STAT6\_NGS) next-generation sequencing are indicated.

As shown in Figure 3, principal component analysis of the RT-MLPA data for the 143 analyzable cases of the GHEDI cohort delineated three subgroups of genes: *IGHM*, *FOXP1*, *TNFRSF13B* and *LIMD1* (ABC DLBCLs signature); *CD30*, *MAL* and *CD23* (PMBL signature); and *ITPKB*, *NEK6*, *LMO2*, *MAML3*, *MYBL1* and *MME* (GCB DLBCLs signature). As expected, *IRF4*, which is expressed in most ABC DLBCLs and PMBLs, clearly distinguished those lymphoma from GCB cases.

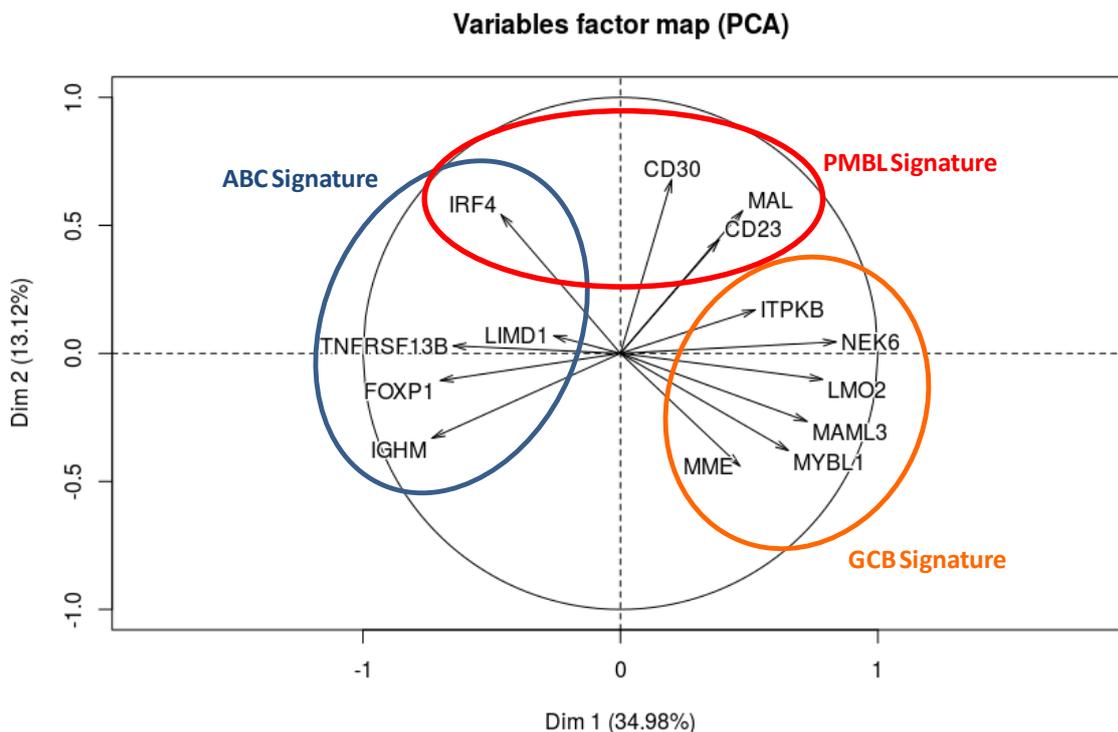
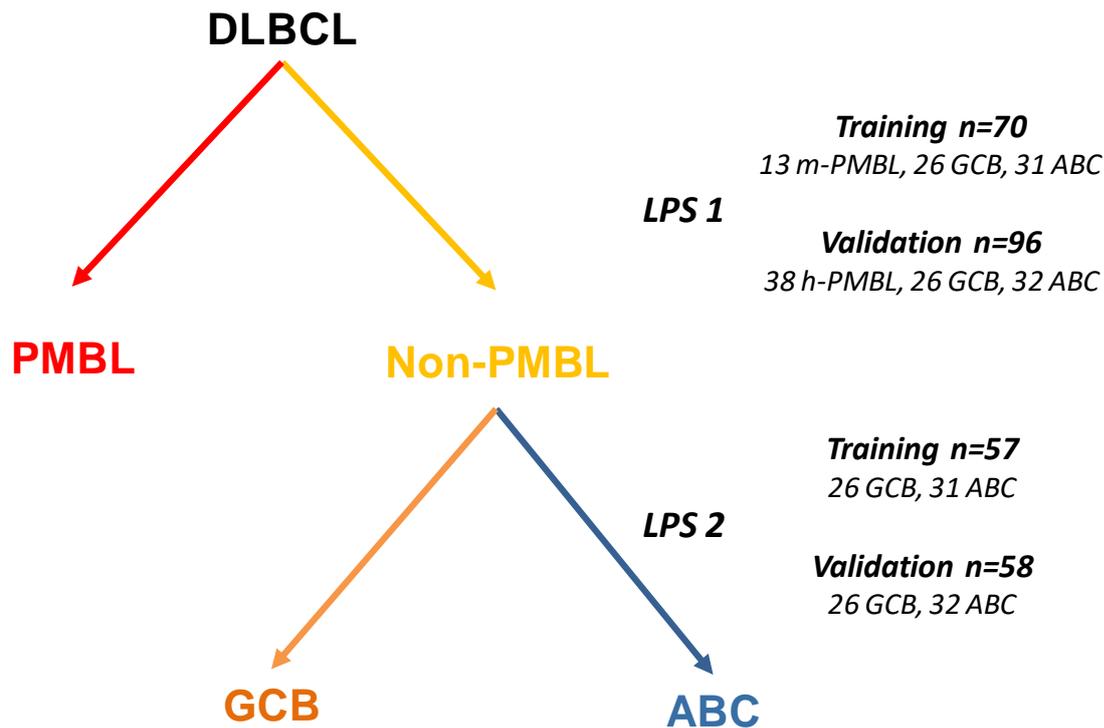


Figure 3 Principal component analysis of the RT-MLPA results

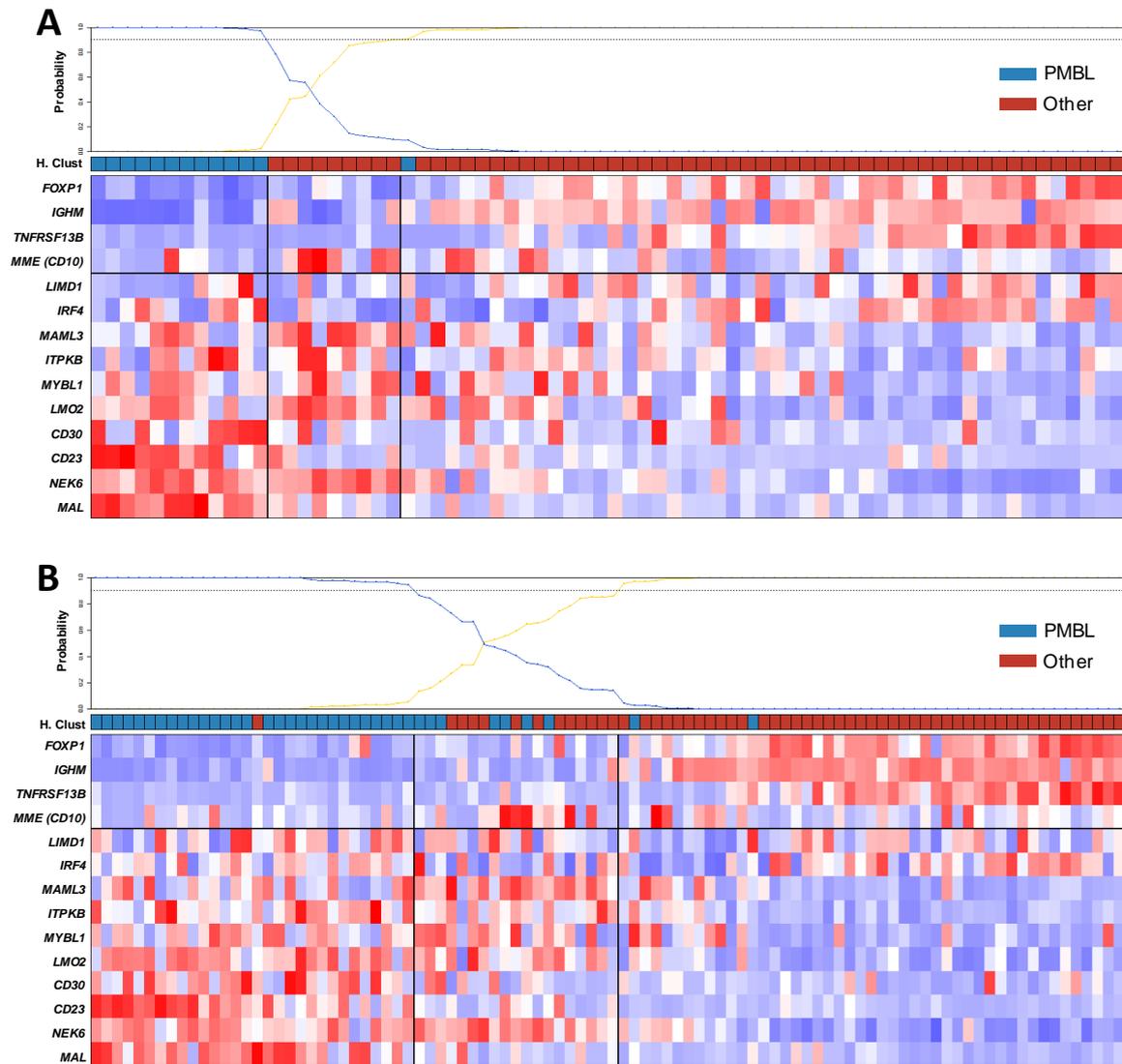
The variables factor map was calculated using the levels of expression of the 13 genes of the GCB, ABC and PMBL signatures evaluated by RTMLPA for the 143 analyzable samples of the GHEDI series. The relationships between the genes of the ABC (*IGHM*, *FOXP1*, *TNFRSF13B*, *LIMD1* and *IRF4*), GCB (*ITPKB*, *NEK6*, *LMO2*, *MAML3*, *MYBL1* and *MME*) and PMBL (*CD30*, *MAL*, *CD23* and *IRF4*) signatures are underlined.



**Figure 4 Principle of the RT-MLPA PMBL/ABC/GCB prediction**

The RT-MLPA assay consists of two successive linear predictor scores (LPS). The first LPS is designed to identify PMBL cases, whereas the second is designed to discriminate GCB from ABC cases. The number of samples that was included to design each LPS is indicated (training and validation cohorts).

To assign each case into one of these three subtypes, a linear predictor score (LPS) methodology was applied to train two consecutive Bayesian predictors. The first was built to identify PMBL cases and the second to discriminate GCB from ABC cases (Figure 4). The first Bayesian predictor was trained using 70 GHEDI samples obtained by retaining all interpretable m-PMBL (n=13) and by randomly selecting half of the GCB (n=26) and half of the ABC (n=31) cases (Figure 5). As expected, the three *CD23*, *CD30* and *MAL* genes were significantly overexpressed in PMBL cases in this series (Figure 6). *IGHM* expression was also significantly lower in these lymphoma, which most often lack immunoglobulin expression. Furthermore, others markers showed discriminant variations including *LMO2* and *NEK6*, two GCB markers, and *TNFRSF13B* and *FOXP1*, two ABC markers.

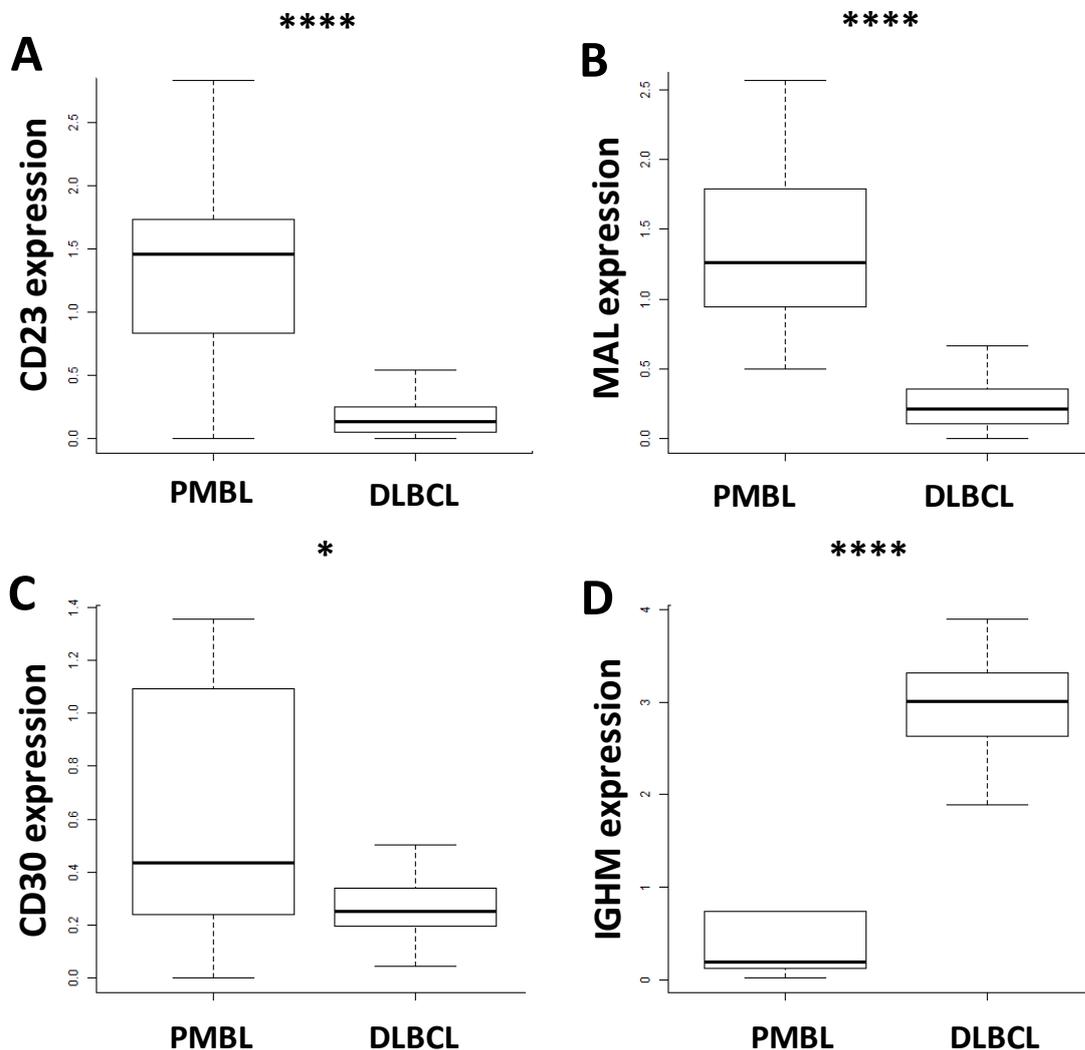


**Figure 5 RT-MLPA PMBL predictor training and validation**

The expression of the fourteen genes included in the PMBL predictor in the training (A) and validation (B) series are presented as heat maps, along with the expected classes computed with the Affymetrix-based unsupervised hierarchical clustering (middle panel) and the predicted probability to belong to each of the groups (top panel). Samples (columns) are ordered by ascending RT-MLPA scores, whereas genes (rows) are ordered by their discriminating power (t statistics displayed on the right).

In this training series, this first predictor correctly identified 12/13 of the m-PMBL cases (92.3%), and none of the 57 non-PMBL biopsies were incorrectly assigned to this subtype (Figure 5A). For validation, the same predictor was next applied to an independent series of 96 cases, which included all remaining GCB (n=26) and ABC (n=32) cases of the GHEDI cohort, and 38 histological PMBLs (h-PMBLs). In this independent cohort, 29 h-PMBLs were classified as PMBLs (76.3%), 7 cases were considered unclassified (18.4%), and 2 cases were classified as non-PMBL (5.3%). Only 1 non-PMBL case of the GHEDI cohort

(classified in the GCB subgroup by hierarchical clustering) was misclassified into this molecular subtype (Figure 5B).

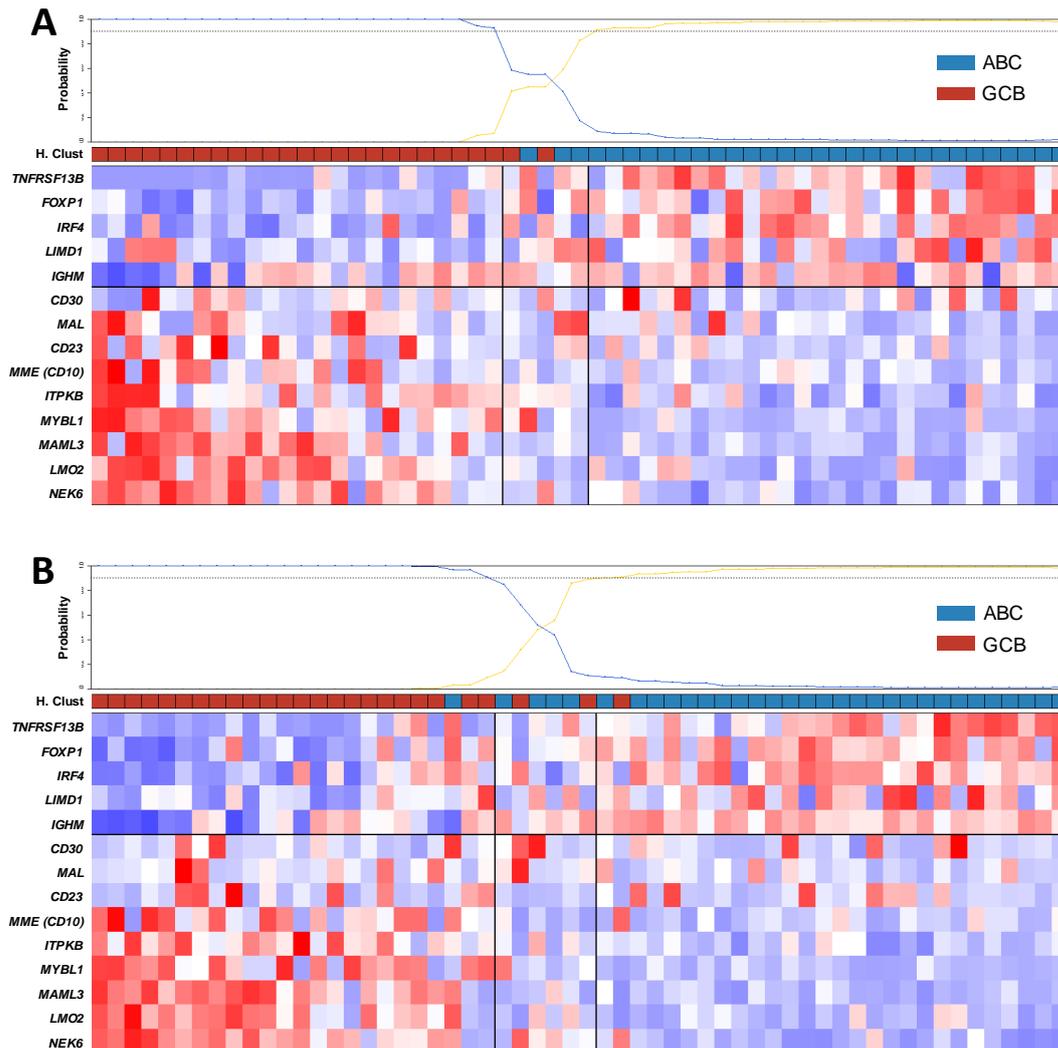


**Figure 6 Differential expressions of PMBL discriminant genes**

Expressions of *CD23*, *CD30*, *MAL* and *IGHM* markers in PMBL subgroup and GCB/ABC subgroup determined by the RT-MLPA classifier in the GHEDI series. \* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , Wilcoxon test.

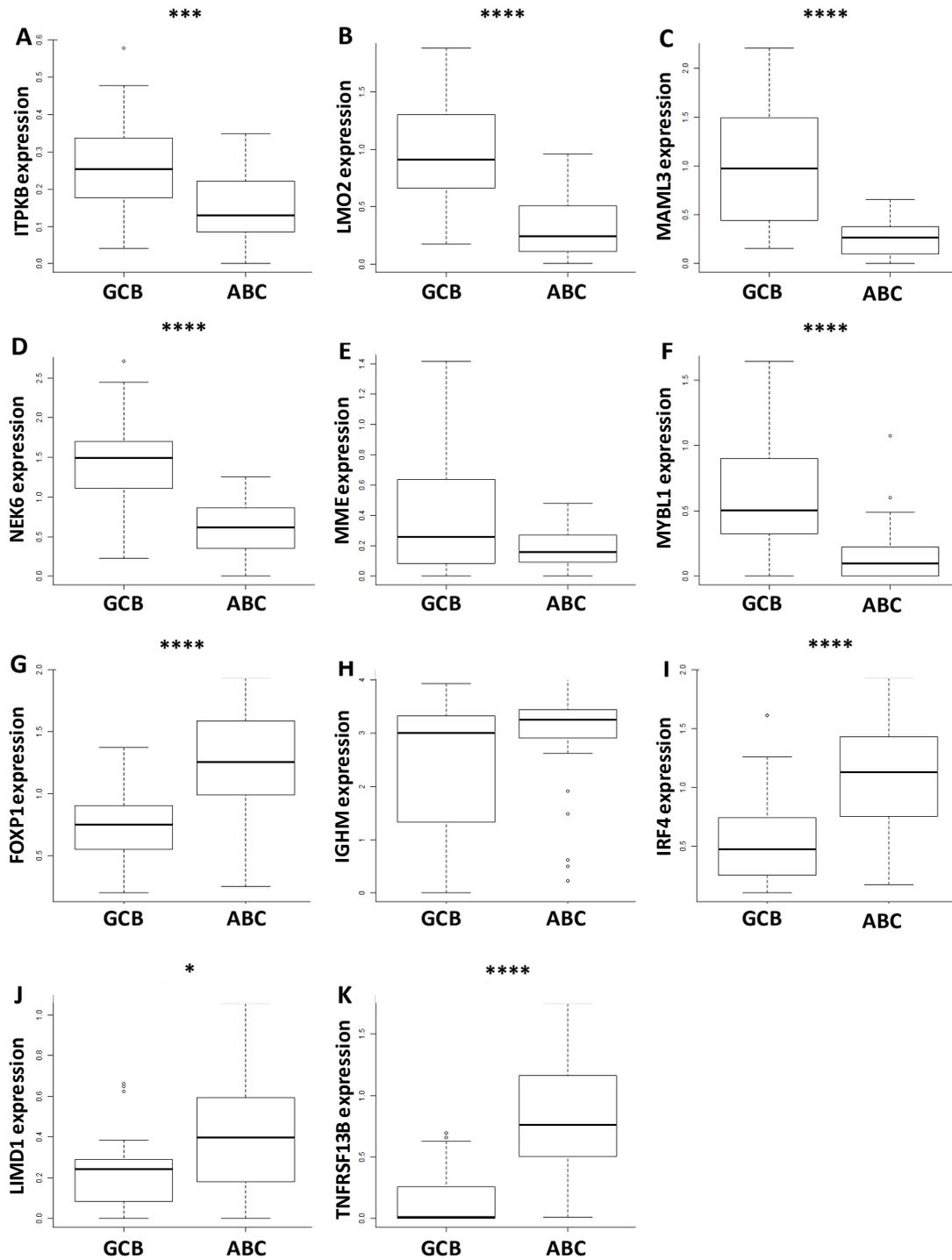
A second Bayesian predictor was built to discriminate ABC from GCB cases. Again, a training series was obtained by randomly selecting half of the GCB ( $n=26$ ) and half of the ABC cases ( $n=31$ ) of the GHEDI cohort. In this series, 52 cases (91.2%) classified within the expected subtypes (28 ABC, 24 GCB) and 5 samples (3 ABC, 2 GCB) were considered unclassified (Figure 7A).

As expected, the expression of *ITPKB*, *LMO2*, *MAML3*, *NEK6* and *MYBL1* were overexpressed in GCB cases (Figure 8A-F), whereas *FOXP1*, *IRF4*, *LIMD1* and *TNFRSF13B* was significantly associated with the ABC subtype (Figure 8G-K). To validate this algorithm, a second independent cohort was analyzed, which comprised all remaining GCB (n=26) and ABC (n=32) cases. Here, 50 cases classified within the expected subtype (27 ABC and 23 GCB; 86.2%), 6 were considered unclassified (4 ABC and 2 GCB; 10.3%) and only 2 were misclassified (1 ABC and 1 GCB; 3.4%)(Figure 7B).



**Figure 7 RT-MLPA GCB/ABC predictor training and validation**

The expression of the fourteen genes included in the GCB/ABC predictor in the training (A) and validation (B) series are presented as heat maps, along with the expected classes computed with the Affymetrix-based unsupervised hierarchical clustering (middle panel) and the predicted probability to belong to each of the groups (top panel). Samples (columns) are ordered by ascending RT-MLPA scores, whereas genes (rows) are ordered by their discriminating power (t statistics displayed on the right).



**Figure 8 Differential expressions of GCB/ABC marker genes**

Expression of the markers included in the GCB/ABC predictors in the GCB (A-F) and ABC (G-K) subgroups determined using the RT-MLPA classifier in the GHEDI series. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , Wilcoxon test.

Overall, the RT-MLPA assay correctly assigned 85.0% of the ABC, GCB and m-PMBL cases of the GHEDI cohort into the expected subtypes (55/63 ABC (87.3%); 46/55 GCB (83.6%); and 12/15 m-PMBL (80%))(Table 2). Seven (4.7%) RT-MLPA profiles were considered uninterpretable, 11 cases (8.3%) were considered unclassified, and 4 cases (3.1%) were misclassified, with 2 GCB classified as ABC and PMBL, 1 ABC classified as GCB, and 1 m-PMBL classified as GCB. Interestingly, the only ABC case misclassified as GCB by RT-MLPA exhibited an *EZH2* Y644 mutation identified by next-generation sequencing. The reason for this discrepancy is unknown, but the strong association between this mutation and the GCB GEP signature has been shown in previous studies<sup>17</sup>.

**Table 2 Comparison of RT-MLPA and Affymetrix GEP results**

Cell of origin classification of the GHEDI series determined by RT-MLPA compared to unsupervised hierarchical clustering from Affymetrix data.

		RT-MLPA				
		GCB	ABC	PMBL	Unclassified	n.i.
Affymetrix	GCB	46	1	1	4	3
	ABC	1	55	0	7	0
	PMBL	1	0	12	0	2
	Unclassified	5	3	2	5	2

By comparison, the Hans IHC algorithm correctly assigned 78.8% of the ABC and GCB cases of the GHEDI cohort (53/63 ABC (84.1%) and 40/55 GCB (72.7%) cases) (Table 3). As expected, a majority of m-PMBL cases (10/14; 71.4%) were classified within the non-GCB subtype by IHC, due to a dominant CD10 negative, BCL6 positive, MUM1 positive immunophenotype. Finally, all 16 unclassified cases classified into the non-GCB subgroup using the Hans algorithm, and nine cases were considered uninterpretable due to a lack of informativity for at least one IHC marker.

**Table 3 Comparison of Immunocytochemistry and Affymetrix GEP results**

Cell of origin classification of the GHEDI series determined by RT-MLPA and IHC (Hans algorithm) compared to unsupervised hierarchical clustering from Affymetrix data.

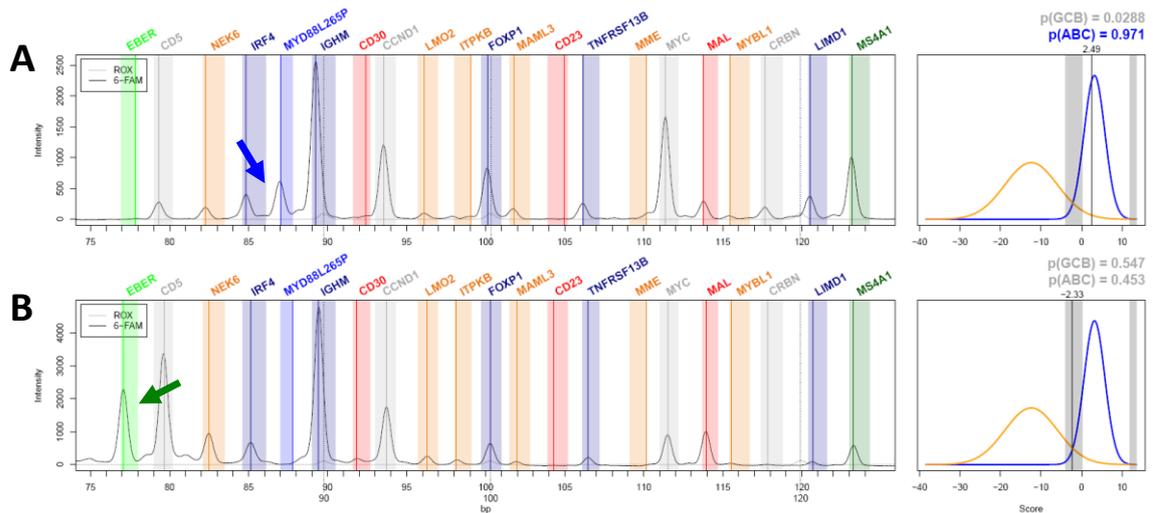
		<b>Hans IHC</b>		
		<b>GCB</b>	<b>ABC</b>	<b>n.i.</b>
<b>Affymetrix</b>	GCB	40	10	5
	ABC	8	53	2
	PMBL	4	10	1
	Unclassified	0	16	1

### **MYD88 L265P mutation detection**

We next verified the capacity of the RT-MLPA assay to correctly detect the *MYD88* L265P mutation. Ten positive control cases from the Centre Henri Becquerel, where the mutation had been previously detected by Sanger sequencing, were tested. As shown in Figure 9A and Supplemental Figure S6, S7 and S8, all showed the expected signal. Sixteen *MYD88* L265P mutations were also detected in the GHEDI cohort. Fifteen had been previously identified by NGS with allele frequencies ranging from 19.8% to 82.1% (median: 46.2%), confirming the sensitivity of the assay. The last mutated case of the GHEDI cohort was not analyzed by NGS due to a lack of available material. Importantly, no false positive calls occurred in the 125 negative cases of the GHEDI cohort previously analyzed by next-generation sequencing, confirming the specificity of the assay (positive predictive value and negative predictive value of 100%). Furthermore, as expected, all 26 mutated cases were classified within the ABC subtype using the Bayesian predictors, which does not take the presence of this marker into account for the classification.

### **EBV infection status evaluation**

We next verified the ability of the RT-MLPA assay to assess the EBV infection status. For the retrospective 10 EBV positive and 10 EBV negative control samples from the Centre Henri Becquerel previously analyzed by *in situ* hybridization were tested. As shown in Figure 9B and Supplemental Figure S9, S10 and S11, all showed the expected *EBER* signal. Only one EBV positive DLBCL case was identified in the GHEDI cohort, and was considered unclassified by the RT-MLPA predictors, the hierarchical clustering approach and the Wright's algorithm.



**Figure 9 Additional RT-MLPA profiles**

RT-MLPA for two representative samples: the MYD88L265P mutation is indicated with a blue arrow (A); EBER expression, indicating EBV infection, with a green arrow (B).

## Discussion

In recent years, major advances have been made in the understanding of the heterogeneity of DLBCLs. According to the 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms, the GCB and ABC DLBCL subtypes should now be identified at diagnosis. IHC algorithms are considered acceptable, but GEP-based methods are seen as promising alternatives. There is therefore an increasing need for accurate diagnostic tools that could be integrated into the diagnostic workflow.

The new RT-MLPA classifier we developed was trained using paraffin-embedded samples as available at most institutions. Interpretable gene expression profiles were obtained for 143/150 (95.3%) of the archival samples of the GHEDI cohort, demonstrating its robustness. Its capacity to provide reliable results even with Bouin- or AFA-treated biopsies, from which RNA extraction is generally considered highly challenging, confirms its resistance to RNA degradation. This advantage, which results from the very short RNA fragments required for the correct hybridization of the RT-MLPA probes, could prove particularly useful in daily practice. The concordance of the RT-MLPA results with the gold standard Affymetrix classification compares favorably to other diagnostic methods such as immunochemistry. More specifically, and as we could verify on the GHEDI cohort, gene expression based assay can directly identify ABC cases thru the expression of specific markers, and do not attribute the samples by default into a non-GCB category when no

GCB markers are detected. Its capacity to interrogate the *MYD88* L265P mutation and the EBV infection status as well as other important markers such as MS4A1 (CD20) or CD30 which are not systematically addressed by IHC could also be particularly useful for therapeutic decision. It also appears as an interesting tool to discriminate PMBL from other DLBCLs, which could soon benefit from targeted therapies.

The diagnosis of PMBL is usually evoked when patients present with mediastinal involvement. However, the diagnosis of these tumors is often challenging, and recent studies have suggested that not all cases show this typical presentation<sup>13</sup>. When applied to these tumors, the Hans IHC algorithm usually returns a non-GCB classification due to a predominant *CD10- BCL6+ IRF4+* immunophenotype. By contrast, the RT-MLPA assay allows a systematic evaluation of three important PMBL markers, *CD30*, *CD23* and *MAL*, as well as *MME* (which encodes CD10, usually negative in these pathologies), *IGHM* (usually negative) and *IRF4* (usually positive). It could thus be particularly useful to identify these cases with atypical clinical presentations. It can also differentiate PMBLs from other DLBCLs that may, by chance, originate in the mediastinal region. This probably occurred for case CHB\_1570, initially diagnosed as a PMBL due to its mediastinal localization, but which clearly showed an ABC gene expression profile.

Our assay also correctly identified all control EBV positive cases and one additional case in the GHEDI cohort. Furthermore, applied to the 23 last consecutive cases who presented in our institution, RTMLPA and EBV-ISH showed a 100% agreement, with two positive and 21 negative cases identified (Data not shown). EBV positive DLBCL of the elderly was introduced in the 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms as a provisional entity restricted to patients older than 50 years and is in general associated with a poor prognosis<sup>23</sup>. However, a recent study comparing older and younger patients reported no significant clinical differences<sup>24</sup>, leading to the extension of this subtype to all ages in the 2016 revision of the classification. Its prevalence is estimated between 5% and 15% of all DLBCL cases<sup>23</sup>, but as EBV testing is not systematically performed at diagnosis, many cases are probably managed as EBV negative DLBCLs. Still, new promising therapeutic approaches are currently under evaluation for these diseases, including antiviral therapy in combination with EBV lytic phase induction<sup>25</sup>, EBV specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs)<sup>26</sup> or chimeric antigen receptor (CAR) T cells. The RT-MLPA assay could thus allow a more systematic identification of those patients.

Among the other therapeutic markers included in the assay, *CD30* is a therapeutic target<sup>27-29</sup>. Likewise, Cereblon (CRBN) is a direct target of lenalidomide and pomalidomide, two drugs currently under clinical evaluation for these tumors<sup>21</sup>. The systematic evaluation of these markers by RT-MLPA could thus be particularly useful in prospective clinical trials testing these new therapies. Also, the RT-MLPA approach proved to be particularly efficient in detecting the *MYD88* L265P mutation, one of the most common genetic abnormalities in ABC DLBCLs, and may be predictive of ibrutinib sensitivity<sup>30,31</sup>.

In conclusion, RT-MLPA appears as an efficient, rapid and cost-effective alternative to the current methods used in the clinic to establish the cell of origin classification of DLBCLs. In contrast to other technological approaches such as RNAseq or Nanostring technologies, its implementation requires only common laboratory equipment, that is, a thermal cycler and a capillary genetic analyzer, and does not necessitate the acquisition of any specialized platform. By allowing the identification of the three major DLBCL subtypes and a simultaneous evaluation of multiple prognostic and theranostic markers and therapeutic targets, RT-MLPA could contribute to a more efficient management of these aggressive tumors in both clinical trials and daily practice.

### **Acknowledgments**

We would like to thank Dr Marie H el ene Delfau, Dr Camille Laurent for the careful reading of the manuscript and their precious comments.

### **Authors contributions**

V.B., VM and P.R. designed and performed research, analyzed and interpreted data and wrote the manuscript. E.B. and S.D. performed research and participated to the interpretation of the data. P.J.V., A.A.S., C.B.S.M., J.P.J., and M.F analyzed the data and developed the class prediction algorithm. L.V., F.D, Y.J.M. and J.M.P. performed histological reviews. K.L. and T.J.M. coordinated sample collection for the LYSA group. G.S., C.H, H.T. and F.J. coordinated the study and supervised analysis.

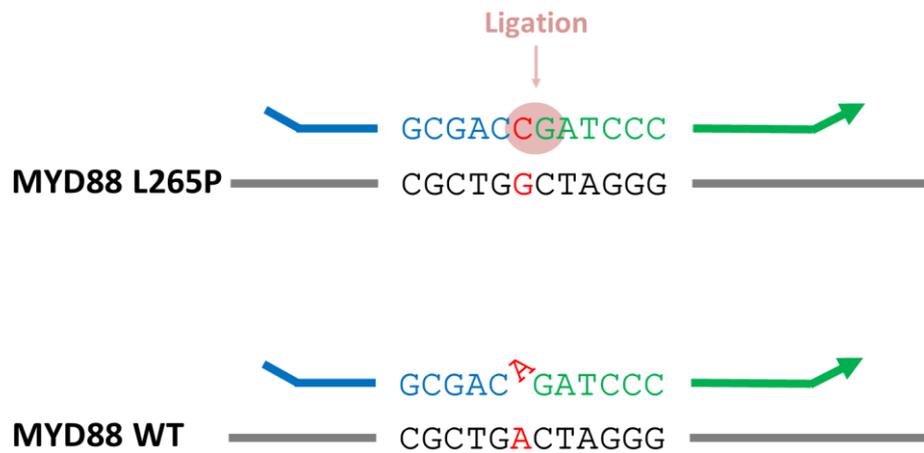
## References

1. Swerdlow, S. H., Campo, E. & Harris, N. L. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition, Lyon, France. International Agency for Research on Cancer, 233-237 (2008).
2. Alizadeh, A. A. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503–511 (2000).
3. Wright, G. et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9991–9996 (2003).
4. Rosenwald, A. et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J. Exp. Med.* 198, 851–862 (2003).
5. Lenz, G. & Staudt, L. M. Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 362, 1417–1429 (2010).
6. Swerdlow, S. H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375–2390 (2016).
7. Salles, G. et al. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood* 117, 7070–7078 (2011).
8. Gutiérrez-García, G. et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 117, 4836–4843 (2011).
9. Scott, D. W. et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* 123, 1214–1217 (2014).
10. Masqué-Soler, N., Szczepanowski, M., Kohler, C. W., Spang, R. & Klapper, W. Molecular classification of mature aggressive B-cell lymphoma using digital multiplexed gene expression on formalin-fixed paraffin-embedded biopsy specimens. *Blood* 122, 1985–1986 (2013).

11. Savage, K. J. et al. Favorable outcome of primary mediastinal large B-cell lymphoma in a single institution: the British Columbia experience. *Ann. Oncol.* 17, 123–130 (2006).
12. Cazals-Hatem, D. et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. A clinicopathologic study of 141 cases compared with 916 nonmediastinal large B-cell lymphomas, a GELA ('Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte') study. *Am. J. Surg. Pathol.* 20, 877–888 (1996).
13. Yuan, J. et al. Identification of Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma at Nonmediastinal Sites by Gene Expression Profiling. *Am. J. Surg. Pathol.* 39, 1322–1330 (2015).
14. Mareschal, S. et al. Accurate Classification of Germinal Center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and Rapid Reverse Transcriptase-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay: A CALYM Study. *J Mol Diagn* (2015).
15. Hans, C. P. et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103, 275–282 (2004).
16. Molina, T. J. et al. Young patients with non-germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma benefit from intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab compared with CHOP plus rituximab: analysis of data from the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte/lymphoma study association phase III trial LNH 03-2B. *J. Clin. Oncol.* 32, 3996–4003 (2014).
17. Dubois, S. et al. Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clin. Cancer Res.* (2016).
18. Pileri, S. A. et al. Pathobiology of primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 44 Suppl 3, S21-26 (2003).
19. Copie-Bergman, C. et al. The MAL gene is expressed in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 94, 3567–3575 (1999).
20. Higgins, J. P. & Warnke, R. A. CD30 expression is common in mediastinal large B-cell lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 112, 241–247 (1999).

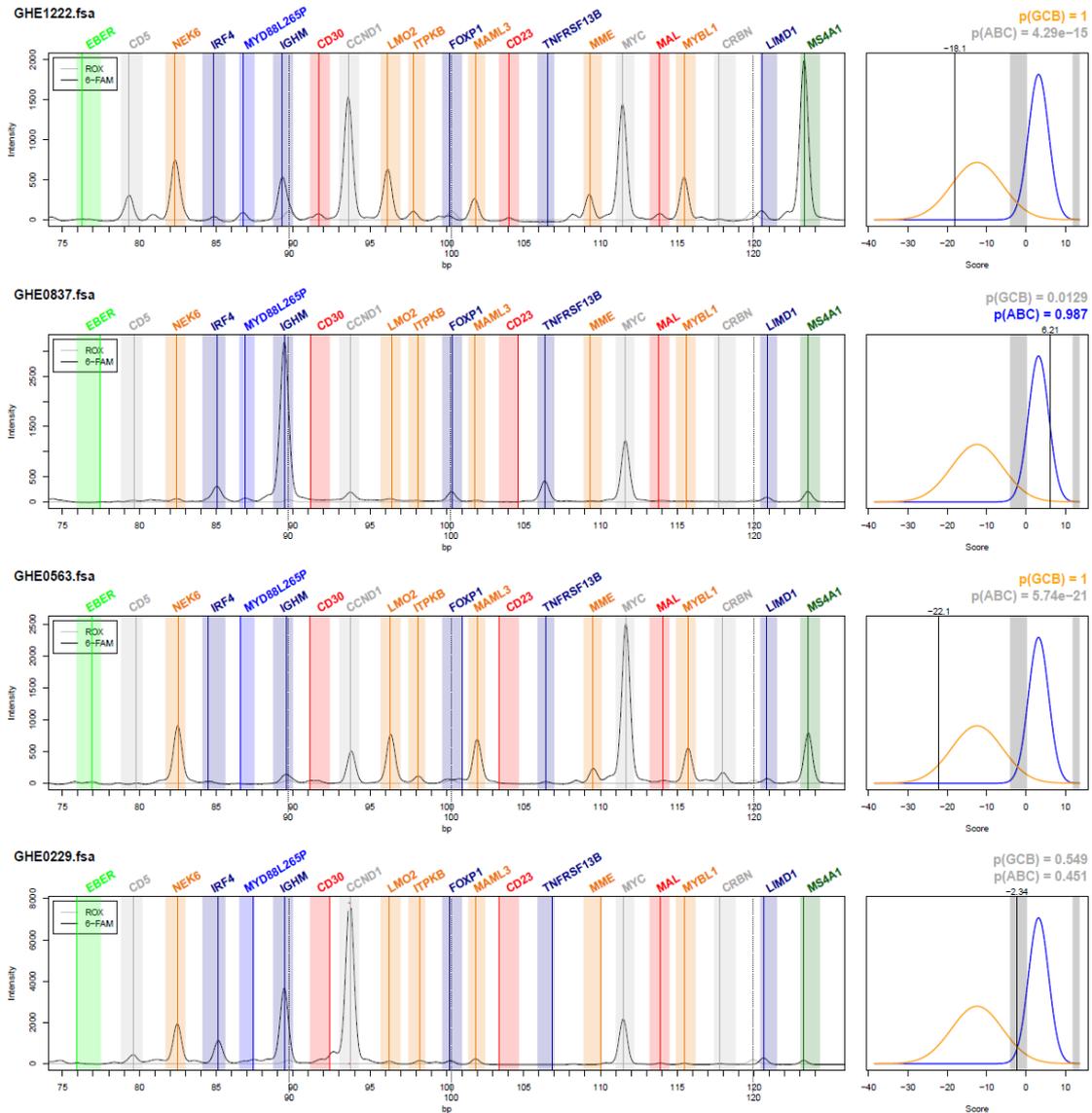
21. Zhang, L.-H. et al. Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B-cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblon expression. *Br. J. Haematol.* 160, 487–502 (2013).
22. Ritz, O. et al. Recurrent mutations of the STAT6 DNA binding domain in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Blood* 114, 1236–1242 (2009).
23. Castillo, J. J. et al. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* 91, 529–537 (2016).
24. Monabati, A. et al. Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Is It Different between Over and Under 50 Years of Age? *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 17, 2285–2289 (2016).
25. Ghosh, S. K., Perrine, S. P., Williams, R. M. & Faller, D. V. Histone deacetylase inhibitors are potent inducers of gene expression in latent EBV and sensitize lymphoma cells to nucleoside antiviral agents. *Blood* 119, 1008–1017 (2012).
26. Wilkie, G. M. et al. Establishment and characterization of a bank of cytotoxic T lymphocytes for immunotherapy of epstein-barr virus-associated diseases. *J. Immunother.* 27, 309–316 (2004).
27. Hu, S. et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* 121, 2715–2724 (2013).
28. Ok, C. Y. et al. Prevalence and clinical implications of epstein-barr virus infection in de novo diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Clin. Cancer Res.* 20, 2338–2349 (2014).
29. Delacruz, W. et al. Novel Brentuximab Vedotin Combination Therapies Show Promising Activity in Highly Refractory CD30+ Non-Hodgkin Lymphoma: A Case Series and Review of the Literature. *Case Rep Oncol Med* 2016, 2596423 (2016).
30. Ngo, V. N. et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 470, 115–119 (2011).
31. Wilson, W. H. et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Med.* 21, 922–926 (2015).

## Supplemental Files



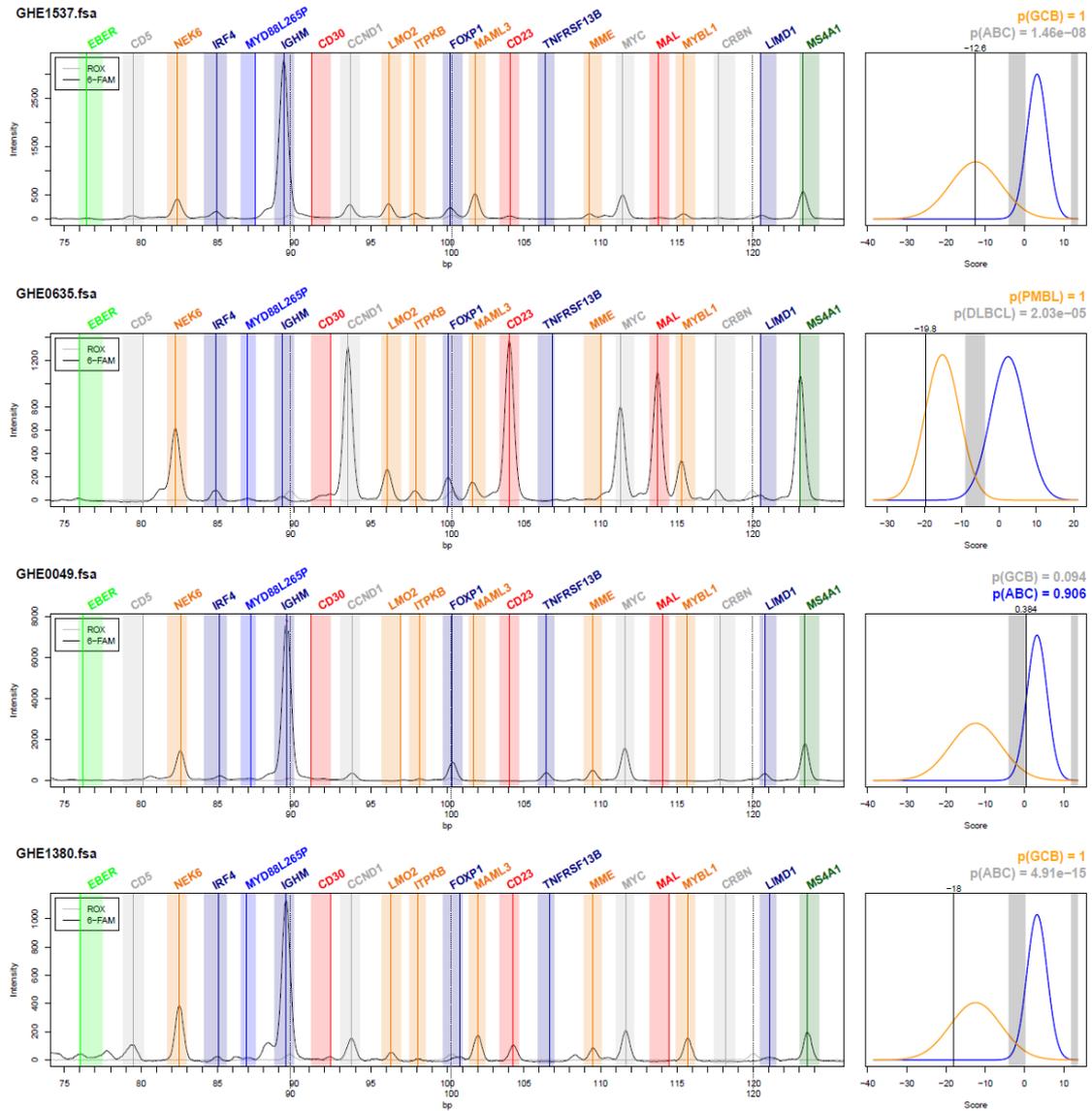
### Supplemental Figure S1 Detection of MYD88L265P mutation by RT-MLPA.

Two RT-MLPA probes were designed to detect the *MYD88*L265P mutation. When this mutation is present, the absence of mismatch at the junction between the two probes allows the ligation to occur and the obtention of an amplification signal.



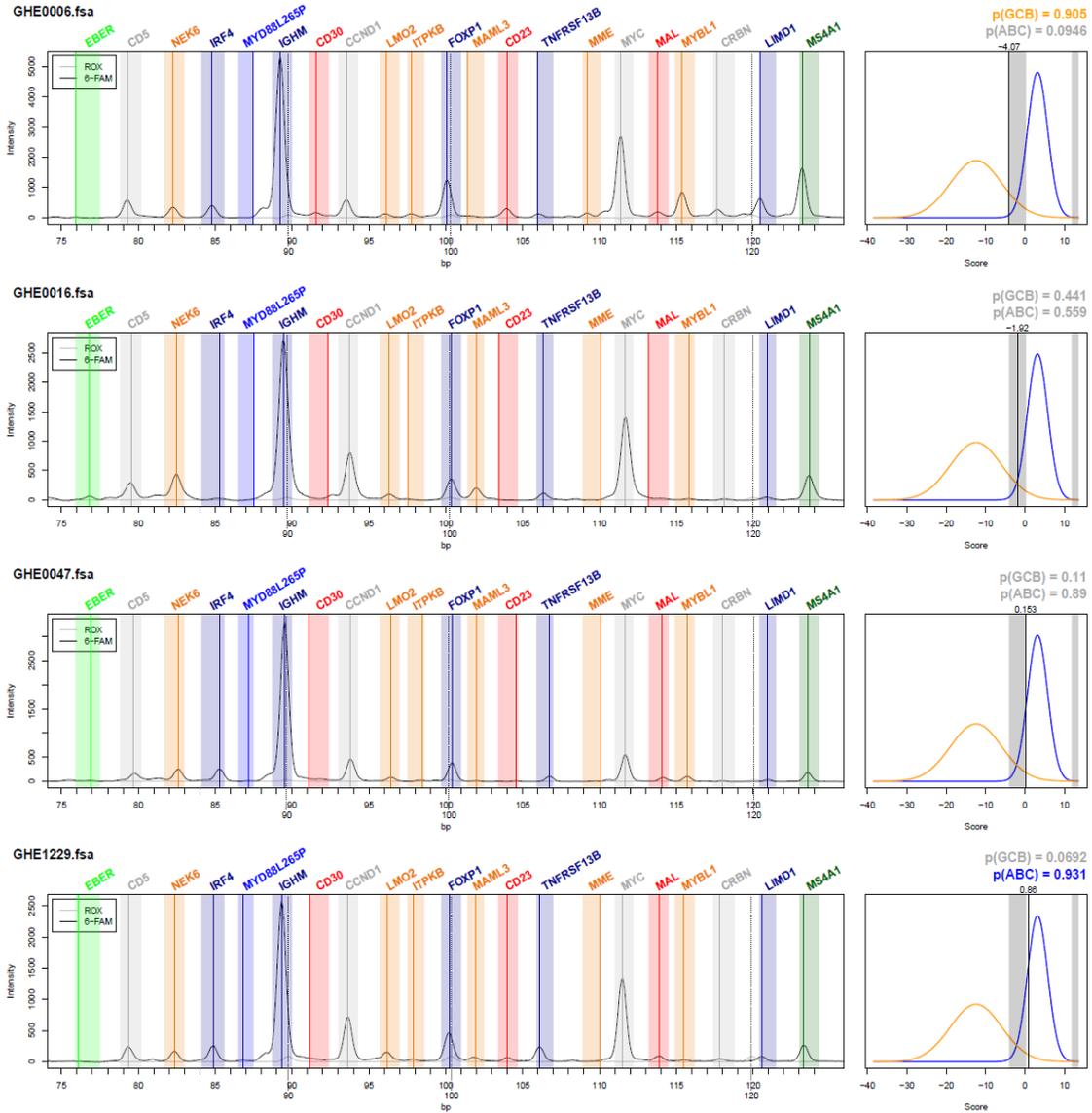
**Supplemental Figure S2: AFA fixed RT-MLPA profiles.**

RT-MLPA profiles for GHE1222.fsa, GHE0837.fsa, GHE0563.fsa, and GHE0229.fsa samples extracted from AFA fixatives.



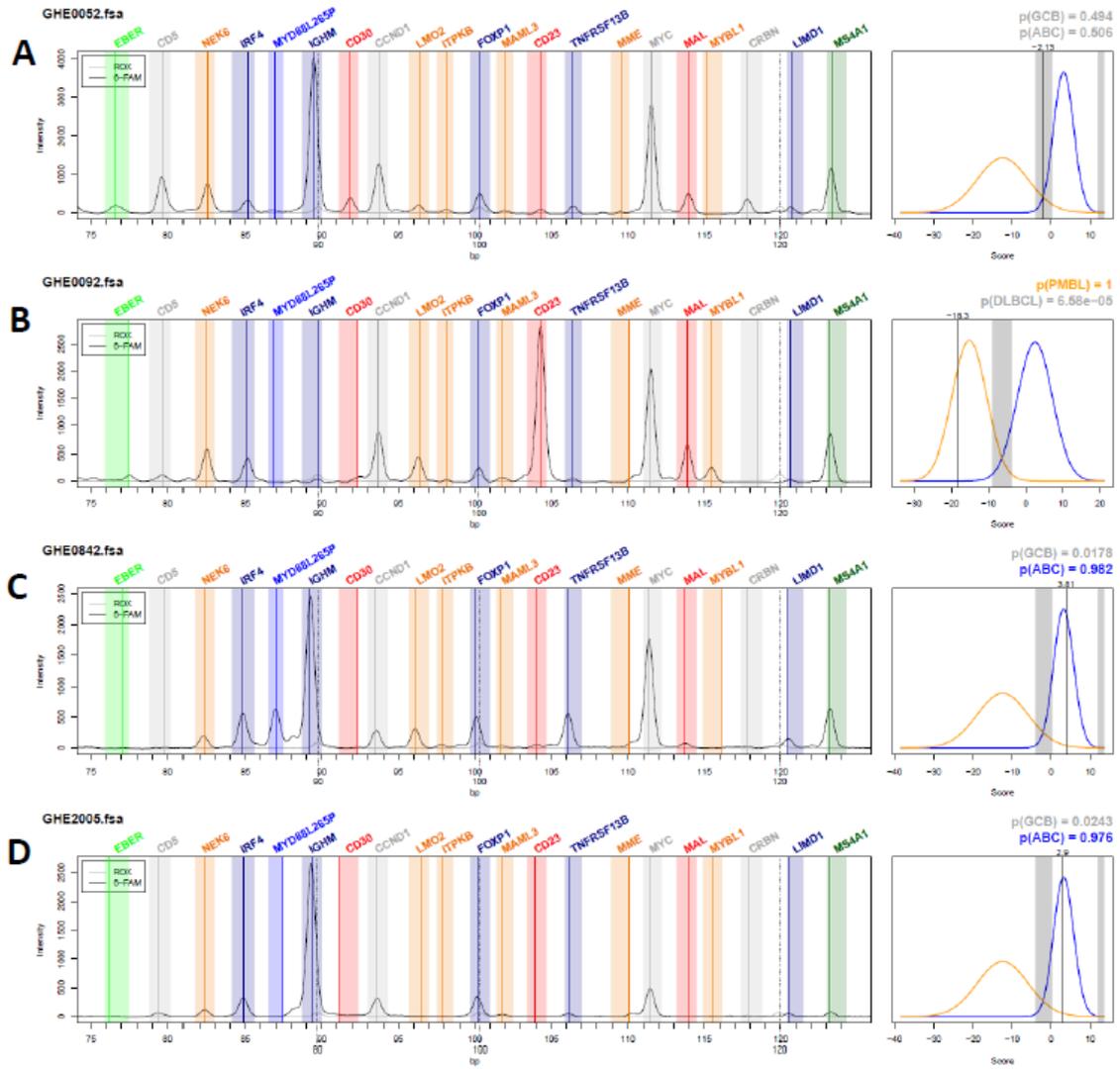
**Supplemental Figure S3: AFA fixed RT-MLPA profiles.**

RT-MLPA profiles for GHE1537.fsa, GHE0635.fsa, GHE0049.fsa, and GHE1380.fsa samples extracted from AFA fixatives.



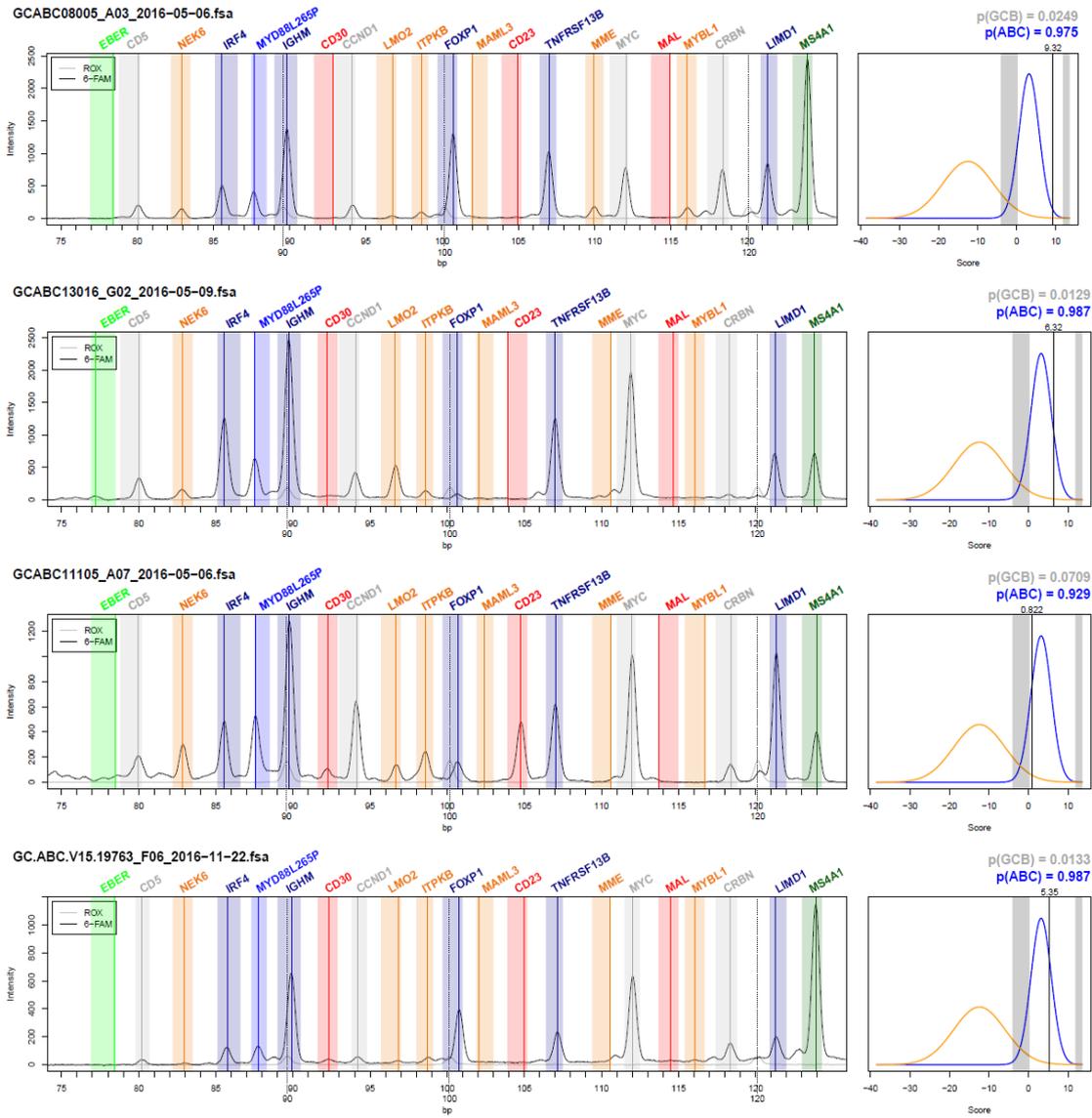
**Supplemental Figure S4: AFA fixed RT-MLPA profiles.**

RT-MLPA profiles for GHE0006.fsa, GHE0016.fsa, GHE0047.fsa, and GHE1229.fsa samples extracted from AFA fixatives.



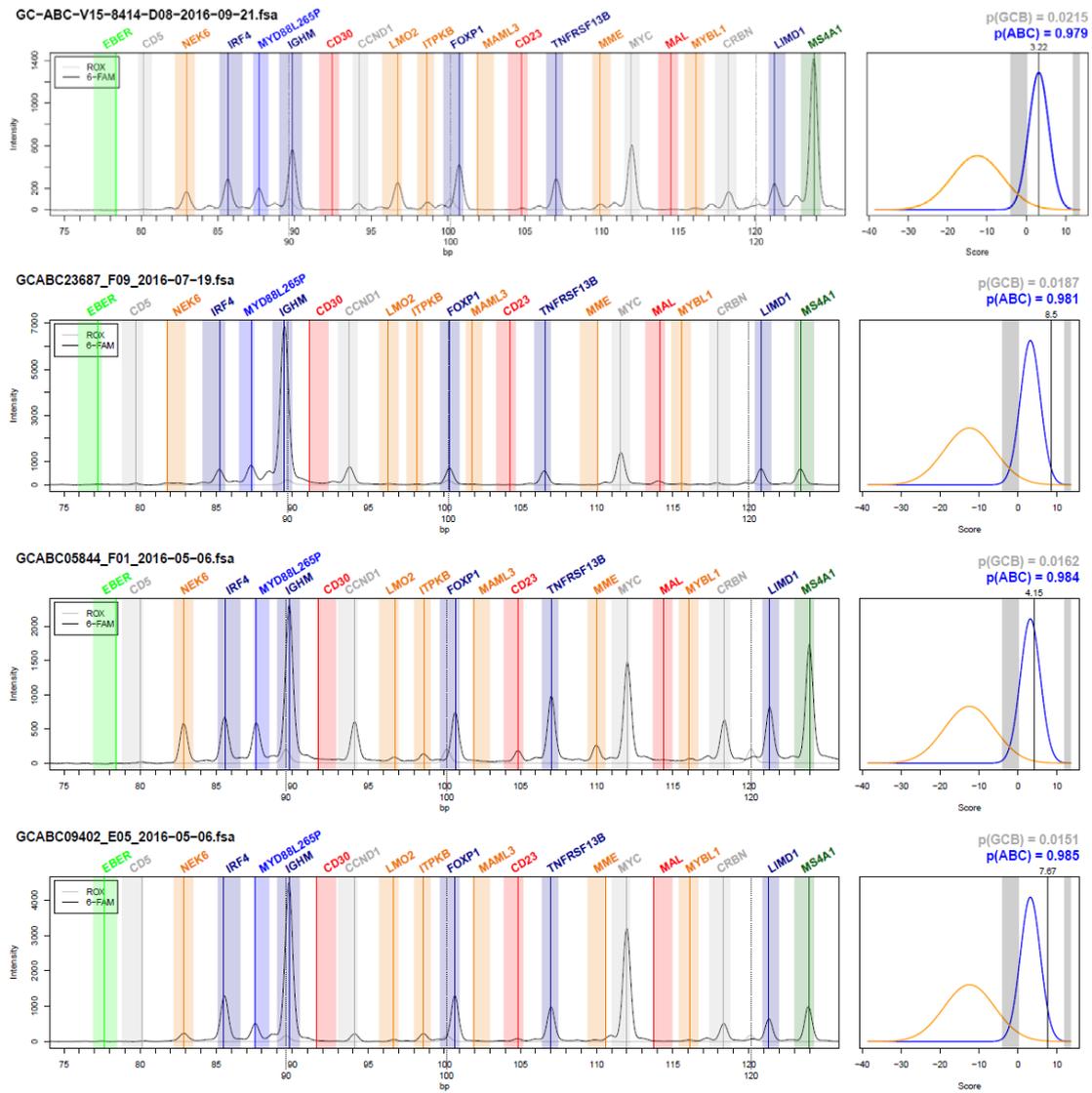
**Supplemental Figure S5: AFA and Bouin fixed RT-MLPA profiles.**

RT-MLPA profiles for samples extracted from AFA (A, GHE0052.fsa) and Bouin (B-D, GHE0092.fsa, GHE0842.fsa, GHE2005.fsa) fixatives are presented.



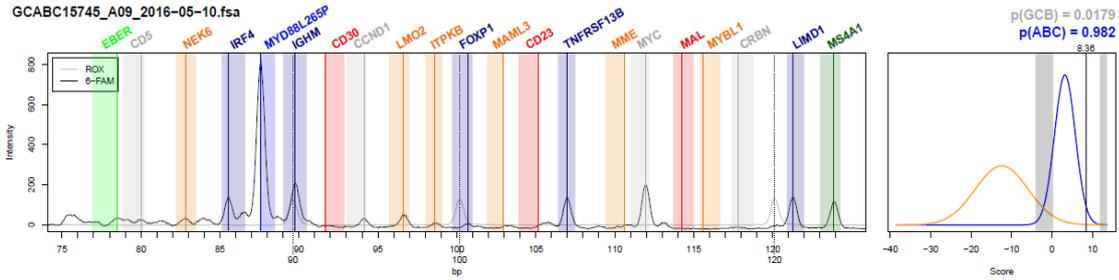
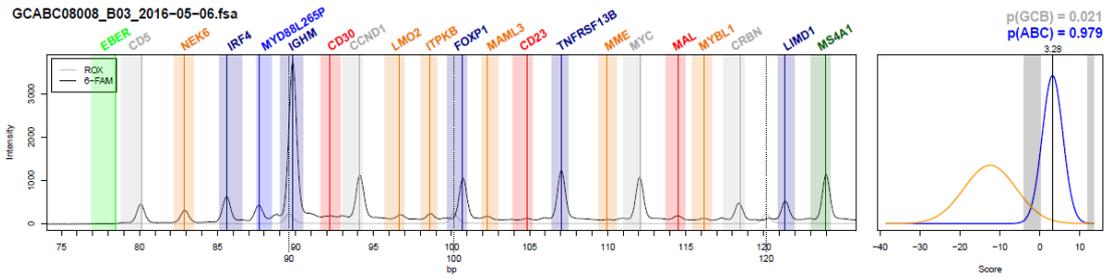
**Supplemental Figure S6: MYD88L265P ABC DLBCL RT-MLPA profiles.**

RT-MLPA profiles obtained from MYD88L265P positive DLBCLs from the Centre Henri Becquerel, previously identified by NGS and Sanger sequencing. Additional profiles are presented in Supplemental Figures S7 and S8.



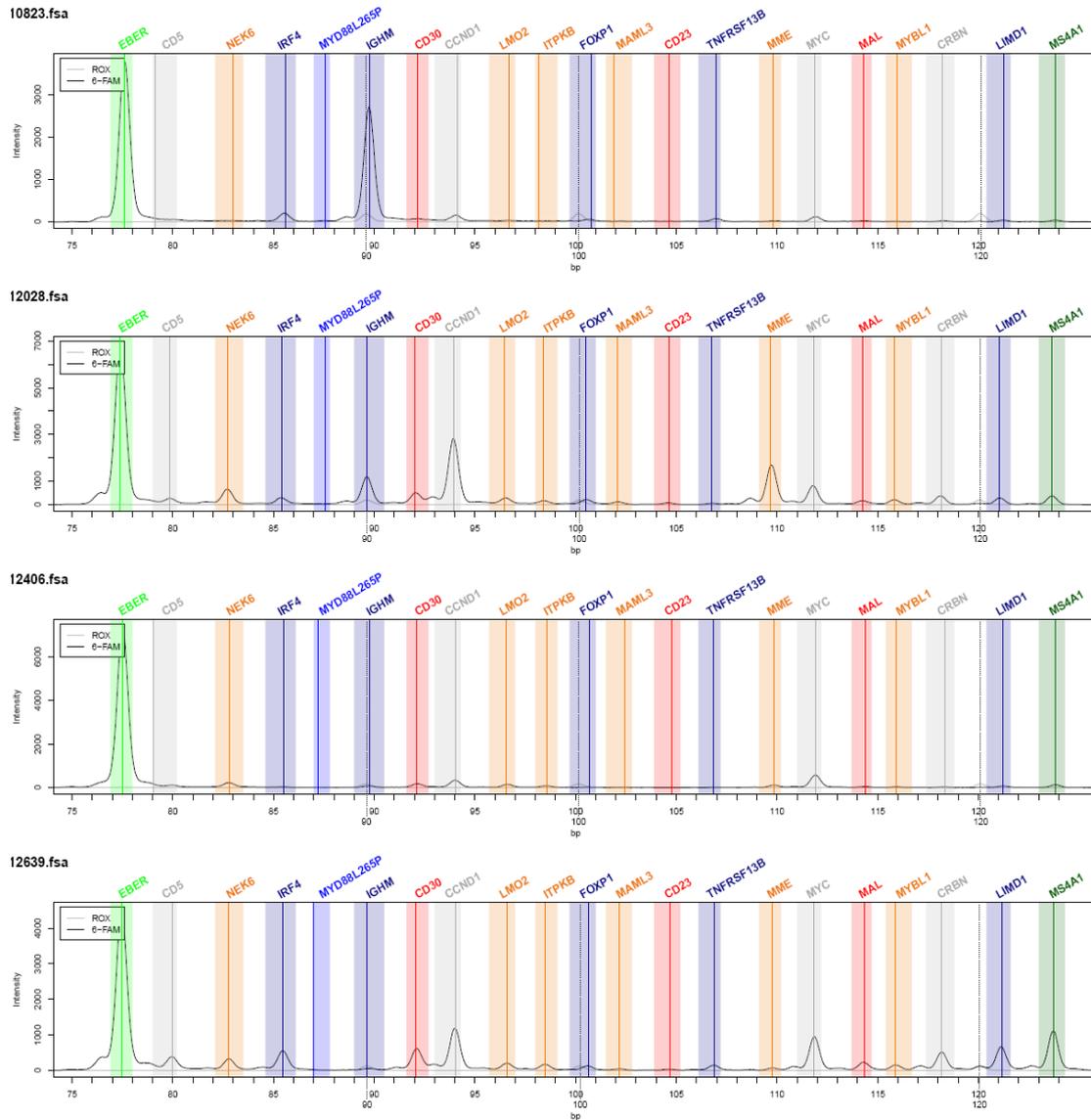
**Supplemental Figure S7: MYD88L265P ABC DLBCL RT-MLPA profiles.**

RT-MLPA profiles obtained from MYD88L265P positive DLBCLs from the Centre Henri Becquerel, previously identified by NGS and Sanger sequencing. Additional profiles are presented in Supplemental Figures S6 and S8.



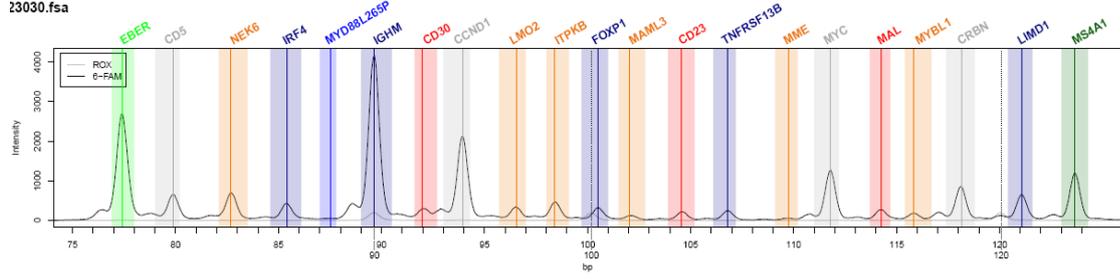
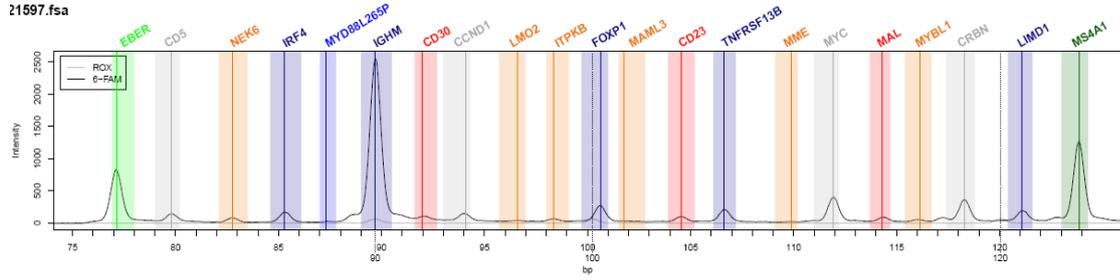
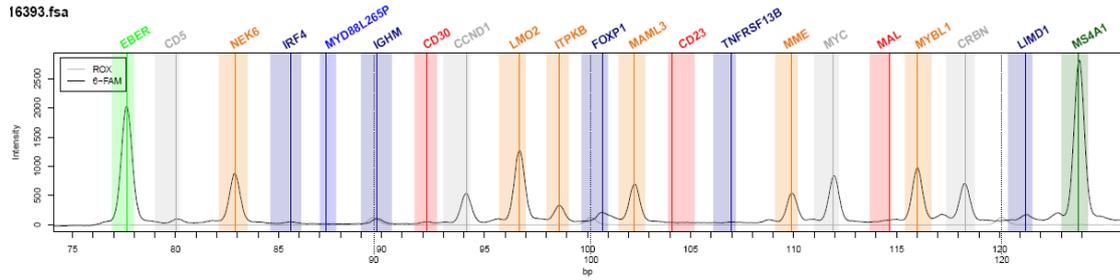
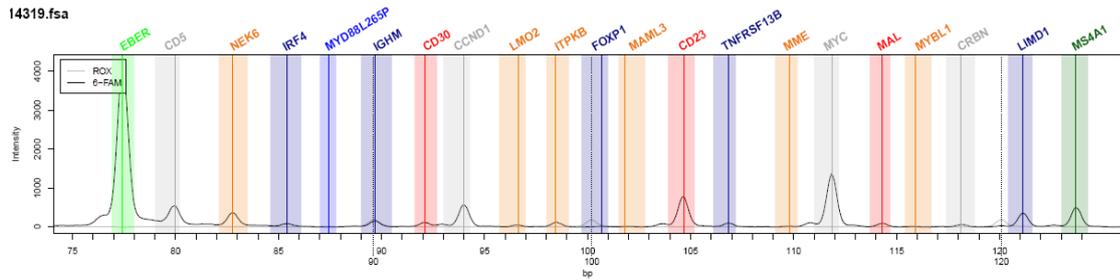
**Supplemental Figure S8: MYD88L265P ABC DLBCL RT-MLPA profiles.**

RT-MLPA profiles obtained from MYD88L265P positive DLBCLs from the Centre Henri Becquerel, previously identified by NGS and Sanger sequencing. Additional profiles are presented in Supplemental Figures S6 and S7.



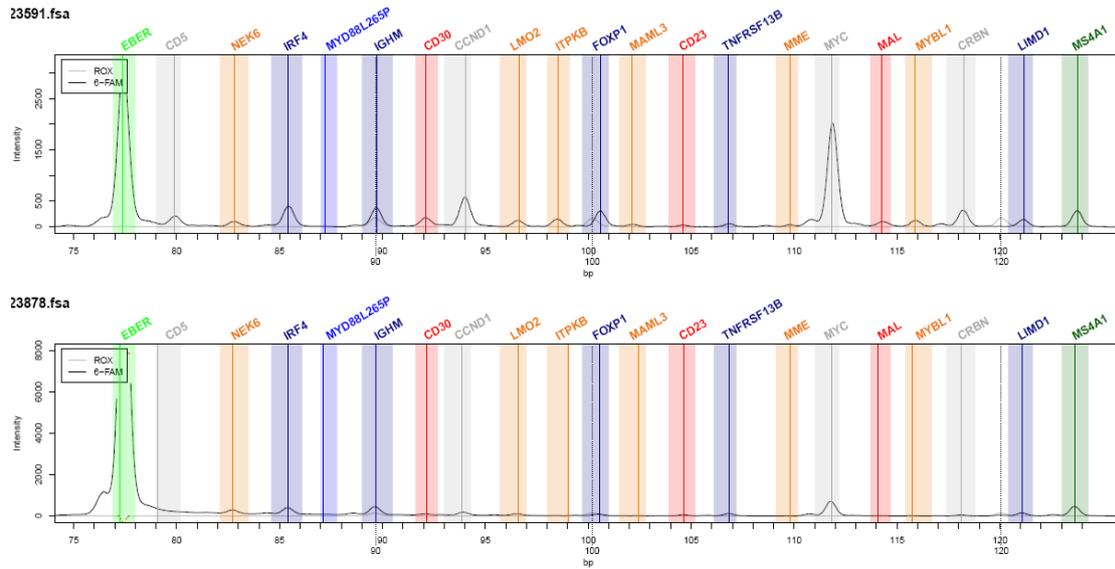
**Supplemental Figure S9: EBV positive DLBCL RT-MLPA profiles.**

RT-MLPA profiles obtained from for EBV positive DLBCL from the Centre Henri Becquerel, previously identified by EBV in situ Hybridization. Additional profiles are presented in Supplemental Figures S10 and S11.



**Supplemental Figure S10: EBV positive DLBCL RT-MLPA profiles.**

RT-MLPA profiles obtained from for EBV positive DLBCL from the Centre Henri Becquerel, previously identified by EBV in situ Hybridization. Additional profiles are presented in Supplemental Figures S9 and S11.



**Supplemental Figure S11: EBV positive DLBCL RT-MLPA profiles.**

RT-MLPA profiles obtained from for EBV positive DLBCL from the Centre Henri Becquerel, previously identified by EBV in situ Hybridization. Additional profiles are presented in Supplemental Figures S9 and S10.

**Supplemental Table 1 List of discriminating genes used for unsupervised hierarchical clustering**

The 95 genes used for the unsupervised hierarchical clustering of the reference series are provided. The genes that were incorporated into the RT-MLPA assay are underlined.

<b>ABC (n=29)</b>	<b>GCB (n=27)</b>	<b>PMBL (n=32)</b>	<b>non-PMBL (n=7)</b>
BATF	ASB13	BATF3	BANK1
BCL2	ATXN1	BST2	CARD11
BLNK	BCL6	CCL17	DLEU1
CCDC50	CSTB	CDKN1A	ITGAE
CCND2	DCK	E2F2	PFDN5
CLINT1	DENND3	FAS	PRKAR1B
CREB3L2	FAM3C	<u>FCER2</u>	TCL1A
CXCR4	GLIPR1	FGFR1	
CYB5R2	GPR18	FNBP1	
ENTPD1	HLA.DMB	IL13RA1	
<u>FOXP1</u>	HLA.DQA1	IL23A	
FUT8	HMG1	ITGAM	
GOT2	<u>ITPKB</u>	JAK2	
IL16	KRT8	LY75	
<u>IRF4</u>	<u>LMO2</u>	<u>MAL</u>	
<u>LIMD1</u>	LRMP	MEF2A	
MARCKS	<u>MAML3</u>	MST1R	
P2RX5	<u>MME</u>	NECAP2	
PIM1	<u>MYBL1</u>	NFKB2	
PIM2	<u>NEK6</u>	PDCD1LG2	
PRKCB	PLEK	RAB29	
PTPN1	PSIP1	RGS9	
SH3BP5	S1PR2	SAMSN1	
SLA	SERPINA9	SETD1A	
SP140	SLAMF1	SNX29	
SPIB	SPINK2	SPINT2	
TCF4	VCL	TLR7	
<u>TNFRSF13B</u>		TNFRSF17	
TPM2		<u>TNFRSF8</u>	
		TNFSF4	
		TRAF1	
		ZBTB38	

## 4 DISCUSSION

Les LBDGC sont des tumeurs hétérogènes sur le plan moléculaire, et les différences importantes entre les sous-types, portant à la fois sur les voies oncogéniques empruntées et sur l'évolution clinique, sont à l'origine du développement de nombreuses thérapies ciblées. Devant l'avancée de celles-ci, la mise à jour 2016 de la classification OMS préconise d'effectuer au diagnostic la détermination des sous-types GCB et ABC. Ces recommandations pourraient bientôt s'appliquer aux PMBL, de diagnostic parfois difficile, et aux LBDGC EBV+ puisque des approches thérapeutiques spécifiques sont en développement dans ces tumeurs particulières. Dans ce contexte, nous avons mis au point un test de détermination moléculaire de ces différentes sous-types, d'application simple, rapide et bon marché pouvant s'appliquer dans tout laboratoire de biologie moléculaire possédant un séquenceur capillaire et fonctionnant sur les prélèvements FFPE.

Ce classifieur est basé sur des profils d'expression génique de 21 marqueurs obtenus par RT-MLPA. Les profils incorporent 6 gènes surexprimés dans les GCB, 5 gènes surexprimés dans les ABC et 3 gènes surexprimés spécifiquement dans les PMBL. Les LBDGC EBV+ sont dépistés par le marqueur *EBER*. Des marqueurs d'intérêt pronostiques ou thérapeutiques sont également inclus tels que *MYC* et *CD5* dont l'expression est associée à un mauvais pronostic, ainsi que *CRBN* qui est une cible du lenalidomide et pomalidomide<sup>46</sup>, médicaments immunomodulateurs dont la place dans la stratégie thérapeutique fait actuellement l'objet d'essais cliniques. L'expression du *CD30*, surexprimé dans les PMBL<sup>70</sup>, pourrait également avoir un intérêt thérapeutique puisqu'un anti-CD30, le Brentuximab Vedotin, est déjà disponible sur le marché et fait l'objet d'essais cliniques dans les PMBL<sup>71</sup>. Les profils incluent également la détection de la mutation récurrente *MYD88* L265P présente dans environ 30% des LBDGC de sous-type ABC<sup>31</sup> et dont la présence pourrait impacter l'action des inhibiteurs du BCR ou de la voie NF-κB en développement<sup>44</sup>. Enfin, la présence de *MS4A1* codant pour le CD20 permet de s'assurer de la présence de lymphocytes B et sert de contrôle interne.

La présence du marqueur *EBER* suffit à classer le LBDGC en LBDGC EBV+. Dans les autres cas, pour permettre la classification d'un échantillon en LBDGC de sous-type GCB, ABC ou PMBL, 2 prédicteurs sont appliqués de façon consécutive à partir du même

profil d'expression génique. D'abord, un premier score est calculé donnant la probabilité d'appartenir au groupe PMBL. Si la tumeur n'est pas identifiée comme un PMBL, un deuxième modèle est appliqué donnant la probabilité d'appartenir aux groupes GCB et ABC. Enfin, si toutes les probabilités d'appartenance sont inférieures à 90%, la tumeur est définie comme *unclassified*. Le test a été conçu dans cet ordre car la signature moléculaire spécifique des PMBL a été définie à l'origine par comparaison avec les non-PMBL qui regroupent les GCB et ABC (Figure 11, page 50). Il convient donc de tester d'abord l'hypothèse d'un PMBL afin d'utiliser la même approche que celle utilisée pour les signatures des puces Affymetrix. De la même façon, les signatures moléculaires des GCB et ABC ont été décrites initialement au sein des LBDGC, *NOS*, excluant les PMBL. Le modèle GCB/ABC intervient donc en second, une fois les PMBL identifiés et exclus de ce modèle.

Pour servir de comparaison à nos résultats, nous avons utilisé les données issues de puces Affymetrix. Afin de disposer de la classification la plus fiable possible, nous avons généré un *clustering* hiérarchique non supervisé à partir des données d'expression des gènes précédemment décrits comme discriminants par Wright<sup>21</sup>, Scott<sup>61</sup> (GCB/ABC) et Rosenwald<sup>49</sup> (PMBL/non-PMBL) sur une série de 150 LBDGC issus de la cohorte GHEDI. La figure générée permet d'identifier les tumeurs avec une signature de type GCB, ABC et PMBL (Figure 2 de l'article, page 111). Onze pour cent des échantillons sont considérés comme *unclassified*, le *clustering* les classant à part avec une expression hétérogène des différents gènes. La validité du *clustering* est confirmée par comparaison avec les résultats de l'algorithme de Wright (Wright\_Bayes sur la figure), considérant uniquement GCB et ABC, et par l'analyse des mutations de *MYD88*, *EZH2* et *STAT6*, particulièrement enrichies dans les sous-types ABC, GCB et PMBL respectivement.

Le test RT-MLPA a été entraîné sur 70 prélèvements FFPE et validé sur plus de 160 prélèvements indépendants. Les résultats de RT-MLPA ont classé 85,0% des échantillons dans le sous-type attendu déterminé par le *clustering*. En excluant les *unclassified*, seuls 3,1% des résultats étaient discordants entre les 2 techniques. Moins de 5% des échantillons FFPE ont été considérés comme ininterprétables, montrant la robustesse de la technique. Considérant l'ensemble des PMBL testés avec un profil interprétable, la RT-MLPA a identifié 80,4% de ces tumeurs comme des PMBL (41/51), démontrant la faisabilité d'une détermination moléculaire des PMBL par une technique utilisable en pratique clinique.

Certains patients atteints de LBDGC n'ont pas d'atteinte médiastinale au diagnostic mais la tumeur présente une signature moléculaire de PMBL. Le test RT-MLPA permet de rectifier le diagnostic de ces cas peu fréquents. De plus, il permet de discriminer les PMBL des LBDGC, *NOS* présentant une atteinte médiastinale au diagnostic.

L'ensemble des techniques moléculaires apparaissent comme supérieures à l'immunohistochimie pour la classification GCB/ABC : en excluant les *unclassified* et les PMBL, l'algorithme de Hans rend des résultats discordants avec le *clustering* dans 15,3% des cas (18/118 cas interprétables). Au total, l'algorithme de Hans permet d'identifier correctement 40/55 GCB (72,7%) et 53/63 ABC (84,1%), tandis que les PMBL et les *unclassified* sont classés en majorité en sous-type non-GC.

Pour les 150 prélèvements de la série GHEDI, nous disposons également des résultats du premier test RT-MLPA GCB/ABC publié en 2015 ainsi que des résultats de la technologie Nanostring nCounter. En excluant les PMBL, les 2 tests RT-MLPA donnent des résultats concordants dans 83% des tumeurs. Les tumeurs classées en *unclassified* par une technique ne sont pas toujours retrouvées en *unclassified* par l'autre test. Cependant, seulement 4 cas (3,6%) sont discordants entre classement GCB et ABC : une tumeur était classée GCB par le 1<sup>er</sup> test et est classée en ABC par le nouveau test, en accord avec le résultat du *clustering*. Trois tumeurs étaient classées ABC par le 1<sup>er</sup> test et sont classées en GCB par le nouveau test : ces 3 cas sont considérés *unclassified* par le *clustering*, pouvant expliquer le passage d'un sous-type à l'autre du fait de l'absence de signature typique. Dans cette série, tous les PMBL définis par le *clustering* étaient classés en GCB par le 1<sup>er</sup> test et tous sauf un ont été bien classés par le nouveau test. Ces résultats confirment la validité du 1<sup>er</sup> test qui est efficace pour assurer la détermination des sous-types GCB/ABC une fois les PMBL exclus. Il est à noter que le nouveau test a permis de bien classer 10 tumeurs de type GCB en plus par rapport à l'ancien test qui les rendait *unclassified*, probablement grâce aux nouveaux marqueurs de la signature GCB incluant *MME* qui code pour le CD10 utilisé dans l'algorithme de Hans.

La technologie Nanostring classe 90,4% des échantillons dans le sous-type GCB ou ABC attendu déterminé par le *clustering*, en excluant les PMBL et les *unclassified* (contre 85,6% pour la RT-MLPA dans les mêmes conditions). Trois discordances avec le *clustering* sont retrouvées avec le test Nanostring. Seuls 3,3% des prélèvements sont en

échec par cette technique. Concernant la classification GCB/ABC, les techniques de RT-MLPA et Nanostring nCounter ont donc des résultats comparables. Cependant, la technique Nanostring nCounter ne permet pas d'identifier les PMBL et les LBDGC EBV+ ; de plus, la RT-MLPA permet la détection de marqueurs pronostiques et thérapeutiques additionnels et dispose d'avantages analytiques et économiques non négligeables.

La MLPA est une technique peu coûteuse (environ 5 € par test), qui permet un rendu de résultat en moins de 24 heures. Elle est facile à réaliser (figure représentant le mode opératoire en annexe 2 page 113) et ne nécessite pas d'équipement spécifique (thermocycleur et séquenceur capillaire uniquement). Plusieurs dizaines d'échantillons peuvent être analysés simultanément. Le résultat est peu dépendant de la qualité des acides nucléiques par rapport à d'autres techniques car de courts fragments d'ARN sont utilisés, ce qui se traduit par un faible taux d'échec et par des résultats satisfaisants sur les prélèvements FFPE largement utilisés en anatomo-pathologie pour la conservation des tissus. La flexibilité de la technique permet d'envisager l'inclusion rapide de nouveaux marqueurs d'intérêt théranostique qui pourraient être identifiés dans le futur. Le déploiement progressif du premier test RT-MLPA GCB/ABC à l'échelon national a déjà montré la très bonne reproductibilité inter-laboratoires de la technique<sup>72</sup>, démontrant que celle-ci était exportable dans tous les laboratoires de biologie moléculaire.

En conclusion, il n'existe pas de test de biologie moléculaire utilisable en pratique clinique ayant été proposé comme pouvant déterminer les différents sous-types de LBDGC, incluant les PMBL et LBDGC EBV+. La RT-MLPA apparaît donc comme une technique de premier choix pour la détermination moléculaire des sous-types de LBDGC qui pourrait permettre à terme la stratification des décisions thérapeutiques.

## 5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hodgkin, null. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Medico-Chir. Trans.* **17**, 68–114 (1832).
2. Virchow, R. *La pathologie cellulaire: Basée sur l'Étude physiologique et pathologique des tissus.* (J.-B. Baillière & Fils, 1861).
3. Bruch, J.-F., Duprez-Paumier, R., Sizaret, D., Kervarrec, T. & Maître, F. Étude historique des lymphomes et de leurs classifications. *Rev. Francoph. Lab.* **2014**, 59–65 (2014).
4. Trumper, L., Brittinger, G. & Diehl, V. Non-Hodgkin's lymphoma: a history of classification and clinical observations. in *Non-Hodgkin's lymphomas*. 3–19 (Lippincott, Williams and Wilkins, 2004).
5. Sternberg, C. Über eine eigenartige, unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Z Heilk* **19**, (1898).
6. Sternberg, C. Zeitschrift für Heilkunde. in *Lymphogranulomatose und Retikuloendothel.* 21–90 (1898).
7. Reed, D. On the pathological changes in Hodgkin's disease, with especial reference to its relation to tuberculosis. 133–196 (1902).
8. Sternberg, C. Ergebnisse der allgemeinen. in *Pathologie und pathologischen* **87**, 1–76 (1936).
9. Herrick, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Yale J. Biol. Med.* **74**, 179–184 (2001).
10. Ewing, J. *Neoplastic diseases, a text-book on tumors, James Ewing ... with 479 illustrations.* Philadelphia, and London, W.B. Saunders Company (1919).

11. Magrath, I. *The Lymphoid Neoplasms 3ed.* (CRC Press, 2010).
12. Rappaport, H. Discussion on: The Pathology and Nomenclature of Hodgkin's Disease. *Cancer Res.* **26**, 1082–1083 (1966).
13. Miller, J. F. a. P. Immunological function of the thymus. *The Lancet* **278**, 748–749 (1961).
14. Hoffbrand, A. V. *Clinical Hematology.* Gower (1988).
15. Harris, N. L. *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**, 1361–1392 (1994).
16. Dubois, S. Profilage moléculaire des Lymphomes Diffus à Grandes Cellules B: vers une médecine personnalisée. DSc, Normandie Université (2016).
17. Küppers, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 251–262 (2005).
18. Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H. & Isaacson, P. G. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* **112**, 4384–4399 (2008).
19. Swerdlow, S. H., Campo, E. & Harris, N. L. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition.* Lyon, France. International Agency for Research on Cancer, 233-237 (2008).
20. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–2390 (2016).

21. Wright, G. *et al.* A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9991–9996 (2003).
22. Camicia, R., Winkler, H. C. & Hassa, P. O. Novel drug targets for personalized precision medicine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a comprehensive review. *Mol. Cancer* **14**, 207 (2015).
23. Castillo, J. J. *et al.* EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* **91**, 529–537 (2016).
24. Beltran, B. E. *et al.* Response and survival benefit with chemoimmunotherapy in Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol. Oncol.* (2017).
25. Bräuninger, A. *et al.* Molecular analysis of single B cells from T-cell-rich B-cell lymphoma shows the derivation of the tumor cells from mutating germinal center B cells and exemplifies means by which immunoglobulin genes are modified in germinal center B cells. *Blood* **93**, 2679–2687 (1999).
26. Bain B. J., Clark D. M. & Wilkins B. S. *Bone Marrow Pathology, Third edition.* Hoboken Etats-Unis, Wiley-Blackwell. 354-355 (2010).
27. Yamada, S., Ishida, Y., Matsuno, A. & Yamazaki, K. Primary diffuse large B-cell lymphomas of central nervous system exhibit remarkably high prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations. *Leuk. Lymphoma* **56**, 2141–2145 (2015).
28. Fontanilles, M. *et al.* Non-invasive detection of somatic mutations using next-generation sequencing in primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget* **8**, 48157–48168 (2017).

29. Jardin, F. *et al.* Recurrent mutations of the exportin 1 gene (XPO1) and their impact on selective inhibitor of nuclear export compounds sensitivity in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Am. J. Hematol.* **91**, 923–930 (2016).
30. Camus, V. *et al.* Detection and prognostic value of recurrent exportin 1 mutations in tumor and cell-free circulating DNA of patients with classical Hodgkin lymphoma. *Haematologica* **101**, 1094–1101 (2016).
31. Dubois, 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.* (2016).
32. Yuan, J. *et al.* Identification of Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma at Nonmediastinal Sites by Gene Expression Profiling. *Am. J. Surg. Pathol.* **39**, 1322–1330 (2015).
33. Kridel, R. *et al.* Cell of origin of transformed follicular lymphoma. *Blood* **126**, 2118–2127 (2015).
34. Derrioux, C., Trinquand, A. & Macintyre, E. Intérêt de l'étude de la clonalité dans les hémopathies lymphoïdes. *Feuill. Biol.* **332**, 5–12 (2016).
35. Coiffier, B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* **26**, 3603–3613 (2007).
36. Peyrade, F. *et al.* Attenuated immunochemotherapy regimen (R-miniCHOP) in elderly patients older than 80 years with diffuse large B-cell lymphoma: a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **12**, 460–468 (2011).
37. Bonnet, C. Prise en charge du lymphome B diffus à grandes cellules en 2012. *Rev. Médicale Suisse* 1582–1590 (2012).

38. Casasnovas, R.-O. *et al.* SUVmax reduction improves early prognosis value of interim positron emission tomography scans in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **118**, 37–43 (2011).
39. Bohers, E. *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 lymphomas at the time of diagnosis. *Haematologica* **100**, e280-284 (2015).
40. Camus, V. *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* 1–9 (2016).
41. Clatot, F. *et al.* Kinetics, prognostic and predictive values of ESR1 circulating mutations in metastatic breast cancer patients progressing on aromatase inhibitor. *Oncotarget* **7**, 74448–74459 (2016).
42. Sozzi, G. *et al.* Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 3902–3908 (2003).
43. Frattini, M. *et al.* Quantitative analysis of plasma DNA in colorectal cancer patients: a novel prognostic tool. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1075**, 185–190 (2006).
44. Tilly, H. & Amarin, S. Le légalidomide en entretien comparé au placebo chez les patients âgés présentant un lymphome diffus à grandes cellules B répondeurs au R-CHOP en première ligne. Analyse de l'essai REMARC, Congrès de la Société Française d'Hématologie, 15-17 mars, Paris. (2017).
45. Zhang, L.-H. *et al.* Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B-cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblon expression. *Br. J. Haematol.* **160**, 487–502 (2013).

46. Alizadeh, A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503–511 (2000).
47. Lenz, G. *et al.* Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2313–2323 (2008).
48. Rosenwald, A. *et al.* Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J. Exp. Med.* **198**, 851–862 (2003).
49. Affymetrix. Site internet Thermofisher, consulté le 30/08/2017, <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/microarray-analysis/transcriptome-profiling-microarrays.html>.
50. Hans, C. P. *et al.* Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **103**, 275–282 (2004).
51. De Jong, D. *et al.* Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications--a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **25**, 805–812 (2007).
52. Benesova, K. *et al.* The Hans algorithm failed to predict outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Neoplasma* **60**, 68–73 (2013).
53. Choi, W. W. L. *et al.* A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 5494–5502 (2009).

54. Muris, J. J. F. *et al.* Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J. Pathol.* **208**, 714–723 (2006).
55. Meyer, P. N. *et al.* Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 200–207 (2011).
56. Visco, C. *et al.* Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia* **26**, 2103–2113 (2012).
57. Gutiérrez-García, G. *et al.* Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* **117**, 4836–4843 (2011).
58. Batlle-López, A. *et al.* Stratifying diffuse large B-cell lymphoma patients treated with chemoimmunotherapy: GCB/non-GCB by immunohistochemistry is still a robust and feasible marker. *Oncotarget* **7**, 18036–18049 (2016).
59. Nanostring. Site internet Nanostring Technologies, consulté le 30/08/2017, <https://www.nanostring.com/scientific-content/technology-overview/ncounter-technology>.
60. Scott, D. W. *et al.* Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* **123**, 1214–1217 (2014).

61. Scott, D. W. *et al.* Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 2848–2856 (2015).
62. Roberts, R. A. *et al.* Quantitative nuclease protection assay in paraffin-embedded tissue replicates prognostic microarray gene expression in diffuse large-B-cell lymphoma. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **87**, 979–997 (2007).
63. Bruce, K. L., Leterme, S. C., Ellis, A. V. & Lenehan, C. E. Approaches for the detection of harmful algal blooms using oligonucleotide interactions. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 95–116 (2015).
64. Collie, A. M. B. *et al.* Molecular subtype classification of formalin-fixed, paraffin-embedded diffuse large B-cell lymphoma samples on the ICEPlex® system. *Br. J. Haematol.* **167**, 281–285 (2014).
65. Hall, J. S. *et al.* QuantiGene Plex Represents a Promising Diagnostic Tool for Cell-of-Origin Subtyping of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J. Mol. Diagn. JMD* **17**, 402–411 (2015).
66. Schouten, J. P. *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* **30**, e57 (2002).
67. MRC Holland. Designing synthetic MLPA probes. <http://mlpa.com> , consulté le 25 août 2017. (2015).
68. Mareschal, S. *et al.* Accurate Classification of Germinal Center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and Rapid Reverse Transcriptase-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay: A CALYM Study. *J. Mol. Diagn. JMD* (2015).

69. Higgins, J. P. & Warnke, R. A. CD30 expression is common in mediastinal large B-cell lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **112**, 241–247 (1999).
70. Zinzani, P. L. *et al.* Brentuximab vedotin in relapsed primary mediastinal large B-cell lymphoma: results from a phase 2 clinical trial. (prepublished) *Blood* (2017).
71. Wilson, W. H. *et al.* Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Med.* **21**, 922–926 (2015).
72. Fusaro, M. Mise en place de la caractérisation GCB / ABC des lymphomes diffus à grandes cellules B par une technique de Reverse Transcription - Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. PharmD, Université Paris Sud (2016).

## 6 ANNEXES

### 6.1 ANNEXE 1 CLASSIFICATION DES HEMOPATHIES LYMPHOÏDES DE LA REVISION 2016 DE L'OMS<sup>20</sup>

<b>Mature B-cell neoplasms</b>	Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma*
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma	<i>Indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract</i>
Monoclonal B-cell lymphocytosis*	Hepatosplenic T-cell lymphoma
B-cell prolymphocytic leukemia	Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
Splenic marginal zone lymphoma	Mycosis fungoides
Hairy cell leukemia	Sézary syndrome
<i>Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>	Primary cutaneous CD30 <sup>+</sup> T-cell lymphoproliferative disorders
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>	Lymphomatoid papulosis
<i>Hairy cell leukemia-variant</i>	Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
Lymphoplasmacytic lymphoma	Primary cutaneous $\gamma\delta$ T-cell lymphoma
Waldenström macroglobulinemia	<i>Primary cutaneous CD8<sup>+</sup> aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma</i>
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*	<i>Primary cutaneous acral CD8<sup>+</sup> T-cell lymphoma*</i>
$\mu$ heavy-chain disease	<i>Primary cutaneous CD4<sup>+</sup> small/medium T-cell lymphoproliferative disorder*</i>
$\gamma$ heavy-chain disease	Peripheral T-cell lymphoma, NOS
$\alpha$ heavy-chain disease	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*	<i>Follicular T-cell lymphoma*</i>
Plasma cell myeloma	<i>Nodal peripheral T-cell lymphoma with TFH phenotype*</i>
Solitary plasmacytoma of bone	Anaplastic large-cell lymphoma, ALK <sup>+</sup>
Extrasosseous plasmacytoma	Anaplastic large-cell lymphoma, ALK <sup>-</sup> *
Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*	<i>Breast implant-associated anaplastic large-cell lymphoma*</i>
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	<b>Hodgkin lymphoma</b>
Nodal marginal zone lymphoma	Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma
<i>Pediatric nodal marginal zone lymphoma</i>	Classical Hodgkin lymphoma
Follicular lymphoma	Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma
In situ follicular neoplasia*	Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma
Duodenal-type follicular lymphoma*	Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma
Pediatric-type follicular lymphoma*	Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma
<i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement*</i>	<b>Posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD)</b>
Primary cutaneous follicle center lymphoma	Plasmacytic hyperplasia PTLD
Mantle cell lymphoma	Infectious mononucleosis PTLD
In situ mantle cell neoplasia*	Florid follicular hyperplasia PTLD*
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS	Polymorphic PTLD
Germinal center B-cell type*	Monomorphic PTLD (B- and T-/NK-cell types)
Activated B-cell type*	Classical Hodgkin lymphoma PTLD
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma	<b>Histiocytic and dendritic cell neoplasms</b>
Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)	Histiocytic sarcoma
Primary cutaneous DLBCL, leg type	Langerhans cell histiocytosis
EBV <sup>+</sup> DLBCL, NOS*	Langerhans cell sarcoma
<i>EBV<sup>+</sup> mucocutaneous ulcer*</i>	Indeterminate dendritic cell tumor
DLBCL associated with chronic inflammation	Interdigitating dendritic cell sarcoma
Lymphomatoid granulomatosis	Follicular dendritic cell sarcoma
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma	Fibroblastic reticular cell tumor
Intravascular large B-cell lymphoma	Disseminated juvenile xanthogranuloma
ALK <sup>+</sup> large B-cell lymphoma	Erdheim-Chester disease*
Plasmablastic lymphoma	
Primary effusion lymphoma	
<i>HHV8<sup>+</sup> DLBCL, NOS*</i>	
Burkitt lymphoma	
<i>Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*</i>	
High-grade B-cell lymphoma, with <i>MYC</i> and <i>BCL2</i> and/or <i>BCL6</i> rearrangements*	
High-grade B-cell lymphoma, NOS*	
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma	
<b>Mature T and NK neoplasms</b>	
T-cell prolymphocytic leukemia	
T-cell large granular lymphocytic leukemia	
<i>Chronic lymphoproliferative disorder of NK cells</i>	
Aggressive NK-cell leukemia	
Systemic EBV <sup>+</sup> T-cell lymphoma of childhood*	
Hydroa vacciniforme-like lymphoproliferative disorder*	
Adult T-cell leukemia/lymphoma	
Extranodal NK-/T-cell lymphoma, nasal type	
Enteropathy-associated T-cell lymphoma	

Provisional entities are listed in italics.  
\*Changes from the 2008 classification.



## 6.3 ANNEXE 3 COMMUNICATION AFFICHEE AU CONGRES DE LA SFH 2017 (SOCIETE FRANÇAISE D'HEMATOLOGIE)

### Détermination moléculaire des Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules par un classifieur de type RT-MLPA

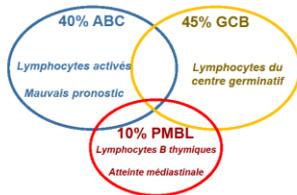


Bobée V<sup>1,2</sup>, Ruminy P<sup>1</sup>, Marchand V<sup>1</sup>, Viailly PJ<sup>1</sup>, Mareschal S<sup>1</sup>, Bohers E<sup>1</sup>, Cornic M<sup>3</sup>, Picquenot JM<sup>1,3</sup>, Tilly H<sup>1</sup>, Jardin F<sup>1</sup>



(1) Inserm U1245, Centre Henri Becquerel, Université de Rouen, IRIB, Rouen (2) Service d'Hématologie biologique, CHU Charles Nicolle, Rouen (3) Service d'Anatomo-Pathologie, Centre Henri Becquerel, Rouen

#### Introduction

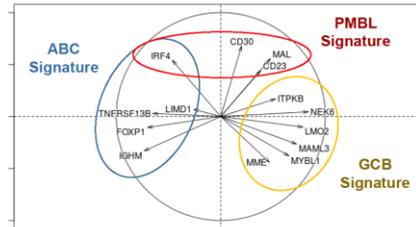
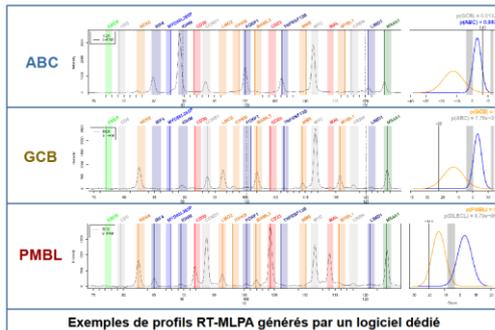


Les lymphomes diffus à grandes cellules de phénotype B (LBDGC) sont les plus fréquents des lymphomes non-hodgkiniens. On distingue trois principaux sous-types moléculaires dérivant de différents stades de différenciation normale du lymphocyte B. Les puces à ADN, considérés comme le Gold Standard, ne sont pas utilisables en routine et les algorithmes d'immunohistochimie souffrent d'un manque de reproductibilité.

Nous avons mis au point un nouveau test de type RT-MLPA (*Retro-Transcriptase Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) mesurant l'expression de 21 marqueurs et permettant un classement simple, rapide et fiable de ces trois sous-types.

Le mode opératoire est réalisable en 5h et nécessite un thermocycleur et un séquenceur capillaire.

#### Résultats



#### Analyse en composantes principales des 14 marqueurs inclus dans les signatures

- L'interprétation est faite par un logiciel dédié utilisant un double prédicteur bayésien
- Le test permet la détection de marqueurs d'intérêt supplémentaires incluant:
  - La détection d'EBER caractérisant les LBDGC EBV+
  - La détection de la mutation *MYD88L265P* fréquente dans les ABC LBDGC

• 150 ARN extraits de biopsies FFPE de LBDGC ont été étudiés. Les résultats ont été comparés avec les données Affymetrix obtenus précédemment sur prélèvements congelés.

**RT-MLPA: 150 ARN FFPE**

- Prédiction exacte dans 85,0% cas
  - 55/63 ABC (87,3%)
  - 46/55 GCB (83,6%)
  - 12/15 PMBL (80%)
- 11 non classés (8,3%)
- 4 mal classés (3,1%)
- 7 échecs (4,7%)

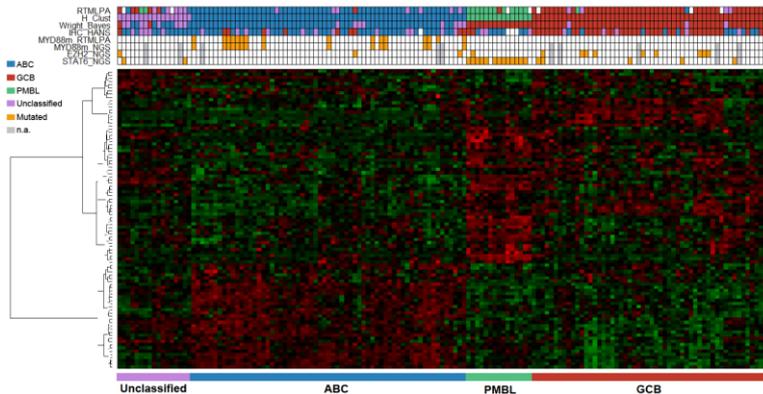
Statut mutationnel selon le Lymphopanel

- Concordance des mutations *MYD88L265P*

---

**Analyse supplémentaire de 38 PMBL**

- 29 bien classés (76,3%)
- 7 non classés (18,4%)
- 2 mal classés (5,3%)



#### Discussion

Bien que la mise à jour 2016 de la classification OMS des hémapathies malignes requiert la détermination moléculaire des sous-types GCB et ABC au diagnostic, elle est encore peu réalisée en pratique. La RT-MLPA apparaît comme une alternative efficace, rapide et peu coûteuse permettant la classification des LBDGC.

En plus d'identifier les 3 sous-types majeurs de LBDGC, elle permet d'évaluer simultanément des marqueurs pronostiques et thérapeutiques et pourrait contribuer à une meilleure prise en charge de ces tumeurs agressives.





## Serment de Galien

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.





## **BOBÉE Victor**

**Détermination moléculaire des sous-types de lymphomes B diffus à grandes cellules par un classifieur de type *retro-transcription multiplex ligation-dependent probe amplification*.**

Th. D. Pharm., Rouen, 2017, 120 p.

---

### **RESUME**

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) représentent 40% des lymphomes non-hodgkiniens. Leur hétérogénéité a été révélée par les profils d'expression génique, permettant un classement en deux sous-types moléculaires: *Germinal Center B-cell like* (GCB), plutôt de bon pronostic, et *Activated B-Cell like* (ABC), plus agressif avec une tendance à la rechute. Nous avons mis au point un nouveau test utilisant une technique de *reverse transcriptase multiplex ligation-dependant probe amplification* mesurant l'expression de 21 marqueurs et efficace pour discriminer non seulement les LBDGC GCB et LBDGC ABC, mais aussi les PMBL (*Primary Mediastinal B-cell Lymphoma*), caractérisés le plus souvent par une atteinte médiastinale et parfois de diagnostic difficile, ainsi que les LDGCB EBV+, non recherchés systématiquement mais pouvant faire l'objet de traitements spécifiques. Ce test a été entraîné sur 70 biopsies conservées en paraffine et validé sur plus de 160 échantillons indépendants. En comparaison avec la classification de référence établie par puces à ADN de type Affymetrix, la RT-MLPA a classé 85,0% des échantillons dans le sous-type attendu. La mutation *MYD88* L265P a également pu être détectée simultanément par cette méthode. Ce test simple, robuste et économique pourrait être utilisé dans les laboratoires de diagnostic pour améliorer la prise en charge de ces tumeurs agressives.

---

**MOTS CLÉS** : Hématologie – Lymphomes – Expression génique – Classification – Diagnostic

---

### **JURY**

**Président :** Pr Isabelle DUBUS, PU

**Membres :** Pr Fabrice JARDIN, PU-PH

Dr Gérard BUCHONNET, MCU-PH

Dr Yannick LE BRIS, PH

Dr Philippe RUMINY

---

**DATE DE SOUTENANCE** : 25 Septembre 2017