



**HAL**  
open science

# Valeur pronostique du profil d'expression génique dans le lymphome de Hodgkin classique déterminé par RT-MLPA : étude exploratoire comparative de deux séries

Imène Rezine Reines

## ► To cite this version:

Imène Rezine Reines. Valeur pronostique du profil d'expression génique dans le lymphome de Hodgkin classique déterminé par RT-MLPA : étude exploratoire comparative de deux séries. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-01829014

**HAL Id: dumas-01829014**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01829014v1>**

Submitted on 3 Jul 2018

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

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

**FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN**

**ANNEE 2018**

**N°**

**THESE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE**

(Diplôme d'état)

Par

**REZINE REINES Imene**

Née le 14/06/1984 à Constantine (Algérie)

Présentée et soutenue publiquement le 18 juin 2018

**Valeur pronostique du profil d'expression génique dans le lymphome de Hodgkin classique déterminé par RT-MLPA : étude exploratoire comparative de deux séries**

**Président de thèse :** Pr. TILLY Hervé

**Directeurs de thèse :** Pr. JARDIN Fabrice, Dr. STAMATOULLAS-BASTARD Aspasia

**Membres du jury :** Pr TAMION Fabienne, Dr Jean-Michel PICQUENOT, Dr Philippe RUMINY, Dr CAMUS Vincent

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2017 - 2018**  
**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**

<b>I - MEDECINE</b>
---------------------

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mr Frédéric <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle <b>APTER</b>	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal <b>BENHAMOU</b>	HCN	Médecine interne
Mr Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
Mme Sophie <b>CANDON</b>	HCN	Immunologie
Mr François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Médecine interne (gériatrie) – Détachement
Mr Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas <b>CORNU</b>	HCN	Urologie
Mr Antoine <b>CUVELIER</b>	HB	Pneumologie

Mr Pierre <b>CZERNICHOW</b> ( <i>surnombre</i> )	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan <b>DARMONI</b> communication	HCN	Informatique médicale et techniques de
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mr Stéphane <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>	CB	Cancérologie
Mr Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean <b>DOUCET</b>	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CB	Radiothérapie
Mr Philippe <b>DUCROTTE</b>	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice <b>DUPARC</b> traumatologique	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et
Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b>	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Dominique <b>GUERROT</b>	HCN	Néphrologie
Mr Olivier <b>GUILLIN</b>	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier <b>HANNEQUIN</b>	HCN	Neurologie
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra <b>LAMIA</b>	Havre	Pneumologie
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile

Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HB	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Benoit <b>MISSET</b>	HCN	Réanimation Médicale
Mr Jean-François <b>MUIR</b> ( <i>surnombre</i> )	HB	Pneumologie
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe <b>MUSETTE</b>	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan <b>PREVOST</b>	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie <b>RIVES</b> reproduction	HCN	Biologie du développement et de la
Mr Horace <b>ROMAN</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépto-gastrologie
Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive

Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Christian <b>THUILLEZ</b> ( <i>surnombre</i> )	HB	Pharmacologie
Mr Hervé <b>TILLY</b>	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles <b>TOURNEL</b>	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier <b>TROST</b>	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre <b>VANNIER</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric <b>VERIN</b>	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>	HB	Rhumatologie
Mme Marie-Laure <b>WELTER</b>	HCN	Physiologie

#### **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mme Valérie <b>BRIDOUX HUYBRECHTS</b>	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Neurophysiologie
Mme Sophie <b>CLAEYSSENS</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
Mr Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
Mr Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas <b>MOUREZ</b>	HCN	Virologie
Mr Gaël <b>NICOLAS</b>	HCN	Génétique
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia <b>ROLLIN</b>	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu <b>SALAUN</b>	HCN	Pneumologie

Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie
Mr David <b>WALLON</b>	HCN	Neurologie

**PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE**

Mr Thierry <b>WABLE</b>	UFR	Communication
Mme Mélanie <b>AUVRAY-HAMEL</b>	UFR	Anglais

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

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

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy <b>BELLIEN</b> (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Camille <b>CHARBONNIER (LE CLEZIO)</b>	Statistiques
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b> santé	Législation pharmaceutique et économie de la
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mr Eric <b>DITTMAR</b>	Biophysique
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie



Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mme Dominique <b>DUTERTE- BOUCHER</b>	Pharmacologie
Mr Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
Mr Gilles <b>GARGALA (MCU-PH)</b>	Parasitologie
Mme Nejla EL <b>GHARBI-HAMZA</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
Mr Hervé <b>HUE</b>	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia <b>LE GOFF</b>	Parasitologie – Immunologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
M. Jérémie <b>MARTINET (MCU-PH)</b>	Immunologie
Mme Marine <b>MALLETER</b>	Toxicologie
Mme Sabine <b>MENAGER</b>	Chimie organique
Mme Tiphaine <b>ROGEZ-FLORENT</b>	Chimie analytique
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

#### **PROFESSEURS ASSOCIES**

Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNCQ</b>	Pharmacie officinale
Mr Jean-François <b>HOUIVET</b>	Pharmacie officinale

#### **PROFESSEUR CERTIFIE**

Mme Mathilde <b>GUERIN</b>	Anglais
----------------------------	---------

#### **ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

Mme Anne-Sophie <b>CHAMPY</b>	Pharmacognosie
M. Jonathan <b>HEDOUIN</b>	Chimie Organique
Mme Barbara <b>LAMY-PELLETER</b>	Pharmacie Galénique

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

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
Mr Roland <b>CAPRON</b>	Biophysique
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX-NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mr Rémi <b>VARIN</b>	Pharmacie clinique
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### **III – MEDECINE GENERALE**

#### **PROFESSEUR**

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG)                      UFR    Médecine générale

#### **MAITRE DE CONFERENCE**

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG)                      UFR    Médecine générale

#### **PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE**

Mr Emmanuel **LEFEBVRE**                                      UFR    Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD**                                      UFR    Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH**                                      UFR    Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX**                                      UFR    Médecine générale

#### **MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES**

Mr Pascal **BOULET**    UFR    Médecine générale

Mr Emmanuel **HAZARD**    UFR    Médecine Générale

Mme Marianne **LAINÉ**    UFR    Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN**    UFR    Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN**    UFR    Médecine générale

## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

### PROFESSEURS

Mr Serguei <b>FETISSOV</b> (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul <b>MULDER</b> (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su <b>RUAN</b> (med)	Génie Informatique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil <b>ADRIOUCH</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle <b>BOUGEARD-DENOYELLE</b> (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine <b>CLEREN</b> (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain <b>FRAINEAU</b> (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline <b>GAILDRAT</b> (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas <b>GUEROUT</b> (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel <b>LETELLIER</b> (med)	Physiologie
Mme Christine <b>RONDANINO</b> (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine <b>OUVRARD-PASCAUD</b> (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric <b>PASQUET</b>	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle <b>TOURNIER</b> (med)	Biochimie (UMR 1079)

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

*HCN - Hôpital Charles Nicolle*

*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*

*CB - Centre Henri Becquerel*

*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*

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

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

## REMERCIEMENTS

Au Professeur Hervé TILLY. Je suis vraiment très honorée que vous présidiez ce jury de thèse. Merci infiniment pour votre disponibilité constante, vos conseils, votre humilité et votre bienveillance durant mes années d'internat. Au-delà de vos compétences unanimement reconnues, vous avez toujours su être à l'écoute et avez guidé mon parcours d'interne. Je ne vous en remercierais jamais assez. Je vous adresse ma plus profonde reconnaissance et mon immense respect.

Au Professeur Fabrice JARDIN et au Docteur Aspasia STAMATOULLAS de m'avoir proposé ce sujet passionnant. Merci pour votre disponibilité et vos relectures attentives tout au long de ces mois de travail. A Fabrice, merci beaucoup pour ta rigueur scientifique et tes précieux conseils. A Aspasia, merci pour ton énergie communicative et pour avoir partagé ta passion pour l'hématologie.

Au Professeur Fabienne TAMION, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, mais surtout pour m'avoir fait partager ta passion de la médecine et de la réanimation. Merci d'avoir cru en moi, en me poussant et en m'encourageant dans de nouveaux défis, en particulier l'inter-CHU au sein du service du Professeur Elie AZOULAY. Tu es pour moi un modèle et une source d'inspiration en tant que médecin, professeur et en tant que femme.

Au Docteur Jean-Michel PICQUENOT d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour vos enseignements et votre disponibilité durant ces six mois passés à vos côtés. Merci pour ces matinées en macro à découper des pièces opératoires, tout en discutant de l'histoire du moyen-âge ou de la dernière grève SNCF. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Au Docteur Philippe RUMINY sans qui ce travail n'aurait jamais pu voir le jour, merci pour ton aide, tes explications, ta disponibilité et tes relectures.

Au Docteur Vincent CAMUS. Tu m'as fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et je t'en suis reconnaissante. Nous avons été co-internes et j'en profite pour saluer ton parcours exemplaire.

Au Professeur Elie AZOULAY, pour avoir accepté de m'accueillir dans votre service, pour votre encadrement au quotidien, vos précieux enseignements et votre disponibilité. Je suis admirative de votre rigueur et de vos compétences que vous avez su partager. Merci infiniment de m'avoir fait confiance, d'avoir su me conseiller et m'orienter dans mes choix.

A Justine LEQUESNE, merci pour ta précieuse aide durant ces mois de travail, merci pour ta disponibilité, ton efficacité et ta rigueur. Sans toi, je n'aurais jamais pu y arriver et je t'en suis infiniment reconnaissante.

A Vincienne, tu détiens les secrets de la recette RT-MLPA « NGS » et tu as accepté de la partager avec moi. Pour cela je t'en suis profondément reconnaissante.

A l'ensemble du département d'Hématologie du Centre Henri Becquerel, Stéphane, Nathalie, Pascal, Hélène, Emilie, Anne-Lise, Vincent, Fabrice, Aspasia et toute l'équipe de l'hôpital de jour, merci pour votre énergie, votre passion pour l'hématologie et votre enseignement.

A toute l'équipe du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du Centre Henri Becquerel. Merci pour votre accueil et votre bonne humeur.

A toute l'équipe du laboratoire de Génétique Oncologique et plus particulièrement à Céline, merci d'avoir guidé mes premiers pas et de m'avoir appris à travailler dans un laboratoire.

A l'ensemble de l'équipe de radiothérapie, merci pour votre accueil, pour les pauses au CLINAC6, merci au Docteur BENYOUCEF et au Professeur DUBRAY pour leurs enseignements. Merci au Docteur Chantal HANZEN pour son énergie et sa force.

A tout les co internes que j'ai pu rencontré,

En particulier aux internes de biologie, à Cédric et Florian pour ces après-midi au multi-tête à essayer de trouver des blastes là où il n'y en avait pas, pour le 15 août, pour les imitations (je pense à Roger Hanin) et pour tout le reste... Encore une fois merci à Cédric pour son amitié, une de mes plus belles rencontres rouennaise.

A Ines, mon amie d'enfance. Nos chemins se sont recroisés par hasard à l'hôpital Saint Louis et j'en suis ravie. Merci pour tes précieux conseils.

Aux internes d'Hématologie, passés actuels et futurs, en particulier Ophélie et Bénédicte.

A l'ensemble de l'unité UMR 1170 de l'Institut Gustave Roussy, Salima, Marie-Charlotte, Kethleen, merci pour cette merveilleuse année de Master 2, merci de m'avoir guidée durant mes premiers pas, merci de m'avoir soutenue surtout quand mes cellules « crevaient » les unes après les autres, et surtout merci pour votre bonne humeur.

Merci au Docteur Camille LOBRY de m'avoir accueillie dans son laboratoire de recherche. Merci pour ton enseignement et ton encadrement au quotidien, merci pour ta confiance, ton humilité. Merci pour les fous rires et les blagues. J'espère vivement qu'un jour, nous aurons l'occasion de travailler à nouveau ensemble.

Je remercie également toutes les équipes médicales et paramédicales que j'ai côtoyées durant mon internat, je ne peux pas tous vous citer, mais sachez que je vous suis tous très reconnaissante.



Je remercie également les quelques mauvaises rencontres que j'ai pu faire durant toutes ces années, car c'est en partie de vous que je tiens ma force.

A ma famille,

A mes parents. C'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui.

Merci d'avoir toujours soutenus mes choix, souvent audacieux, et d'avoir toujours cru en moi.

A mon père Aziz, merci pour ton soutien durant toutes ces années difficiles, je pense notamment à la P1 et au jour où je t'ai envoyé un SMS pour te donner mon classement final.

A ma mère Houda, merci pour ton amour inconditionnel, merci d'avoir été là dans les moments de découragement et d'avoir su trouver les mots. Mon parcours fut long et difficile et tu as toujours cru en moi.

A mon époux, Sébastien. Il n'y aura jamais assez de mots pour t'exprimer ce que je ressens. Tu m'as toujours soutenue. Tu as toujours encouragé mes choix et tu m'as permis de les réaliser. Tu es mon socle et ma boussole. Merci de me supporter au quotidien ! Merci d'être à mes côtés.

A mon fils Khalil, mon soleil. Tu m'as appris à être sereine. Merci pour tes éclats de rire et tes crises de larmes, pour les réveils en douceur et les réveils nocturnes, merci d'être là.

Au petit être qui grandit en moi, merci pour ton soutien permanent à mes côtés, je pense que le lymphome de Hodgkin et la RT-MLPA n'ont plus aucun secret pour toi, merci de rester bien au chaud dans mon utérus et de me laisser le temps de finir ma thèse, j'attends notre rencontre avec impatience.

A ma belle-famille, merci pour votre bonne humeur à toute épreuve, pour les repas arrosés au champagne, pour votre accueil et votre soutien.

A Marianne, Axelle, David et Clemmy, merci pour votre amitié sincère et « concrète » .... !

A SR Clip & Conseil pour le soutien logistique. Deux écrans 27 pouces, un macbook, un bureau et une machine à café au cœur de la Défense, c'est assez confortable pour rédiger une thèse.

A Moussa, repose en paix.

Et comme le porte un être cher, « Il est grand temps de rallumer les étoiles ».

# TABLE DES MATIERES

<b>ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>24</b>
I. CARACTERISTIQUES HISTOLOGIQUES .....	24
II. CELLULE D'ORIGINE .....	26
III. LYMPHOMAGENESE.....	27
1. Voies de signalisation.....	27
2. Facteurs de transcription.....	31
3. Lésions génétiques.....	33
4. Apoptose.....	37
5. Microenvironnement tumoral .....	37
6. Rôle du virus EBV.....	39
7. Cytokines .....	40
IV. PRESENTATION CLINIQUE ET EVALUATION PRE-THERAPEUTIQUE .....	41
V. TRAITEMENT.....	42
VI. LES NOUVEAUX MARQUEURS PRONOSTICS : LES BIOMARQUEURS .....	44
1. Etude du profil d'expression génique ou <i>Gene Expression Profiling</i> (GEP).....	44
2. TEP-FDG et biomarqueurs .....	49
VII. PRINCIPE DE LA RT-MLPA COUPLEE AU SEQUENÇAGE NOUVELLE GENERATION (NGS)	
50	
1. Principe de la MLPA .....	50
2. Profil d'expression génique par RT-MLPA .....	51
<b>OBJECTIF .....</b>	<b>54</b>
<b>MATERIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>55</b>
I. ECHANTILLONS ET PATIENTS .....	55
II. EVALUATION DE LA REPOSE AU TRAITEMENT .....	56
III. RT-MLPA COUPLEE AU SEQUENÇAGE NGS .....	56
1. Principe général .....	56
2. Etape de RT-MLPA.....	57
3. Séquençage Illumina.....	58
4. Adaptation de la technique RT-MLPA au LHc.....	59
IV. IMMUNOHISTOCHIMIE .....	61

V. ANALYSE STATISTIQUE .....	62
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>63</b>
I. CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET DEMOGRAPHIQUES .....	63
II. SURVIE GLOBALE (OS) ET SURVIE SANS PROGRESSION (PFS) .....	65
III. ANALYSE DE L'EXPRESSION GENIQUE GLOBALE .....	68
IV. CORRELATION ENTRE LES DONNEES D'IMMUNOHISTOCHEMIE ET DE TRANSCRIPTOME	72
V. DONNEE D'EXPRESSION GENIQUE DES GENES SIGNIFICATIFS .....	73
1. Sélection des gènes .....	73
2. Expression différentielle des gènes <i>BCMA</i> et <i>MYC</i> entre les groupes RC et RR..	74
VI. COURBES DE SURVIE EN FONCTION DE L'EXPRESSION DE <i>BCMA</i> ET <i>MYC</i> .....	76
1. Gène <i>BCMA</i> .....	76
2. Gène <i>MYC</i> .....	79
VII. PROPOSITION D'UN ALGORITHME DE CLASSIFICATION.....	82
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>83</b>
I. LA TECHNIQUE RT-MLPA « NGS » EST UNE APPROCHE INNOVANTE APPLIQUEE POUR LA PREMIERE FOIS AU LYMPHOME DE HODGKIN .....	83
II. LES DONNEES DE RT-MLPA « NGS » CORRELENT AVEC CERTAINES DONNEES IMMUNOHISTOCHEMIQUES .....	84
III. UN PROFIL D'EXPRESSION GENIQUE PERMET DE DIFFERENCIER LES PATIENTS EN RECHUTE ET/OU REFRACTAIRES DES PATIENTS EN REMISSION COMPLETE PROLONGEE. ....	86
IV. NOTRE ETUDE EST LIMITEE PAR UN FAIBLE EFFECTIF ET L'ABSENCE DE COHORTE DE VALIDATION .....	89
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>90</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>90</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>91</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>104</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>TABLEAU 1 : PRINCIPALES LESIONS GENETIQUES DANS LA CELLULE DE HRS</b> .....	36
<b>TABLEAU 2 : PRINCIPALES ETUDES DE GEP DANS LE LH</b> .....	48
<b>TABLEAU 3 : SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES UNIVERSELLES UTILISEES POUR LA RT-MLPA « NGS »</b> .....	57
<b>TABLEAU 4 : LISTE DES GENES RT-MLPA ADAPTEE AU LHC</b> .....	60
<b>TABLEAU 5 : CARACTERISTIQUES DES ANTICORPS UTILISES EN IMMUNOHISTOCHEMIE.</b> .....	61
<b>TABLEAU 6 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET DEMOGRAPHIQUES DES PATIENTS INCLUS</b> 65	
<b>TABLEAU 7 : EXPRESSIONS GENIQUES MOYENNES DES GENES ANALYSEES PAR RT-MLPA DANS LA COHORTE (N = 33) (CLASSEMENT DES GENES PAR ORDRE ALPHABETIQUE)</b> ....	71
<b>TABLEAU 8 : CORRELATION ENTRE IHC ET DONNEES D'EXPRESSION GENIQUE</b> .....	73
<b>TABLEAU 9 : CORRECTION DE BONFERRONI APPLIQUEE AUX GENES SIGNIFICATIFS</b> .....	74
<b>TABLEAU 10 : TABLEAU COMPARATIF DES DEUX TECHNIQUES RT-MLPA.</b> .....	83
<b>TABLEAU 11 : SIGNATURES MOLECULAIRES DES 15 GENES SELECTIONNES</b> .....	86
<b>FIGURE 1 : ASPECTS IMMUNOHISTOCHEMIQUES DU LHC</b> .....	25
<b>FIGURE 2 : CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES DIFFERENTS SOUS-TYPES DE LHC.</b> .....	26
<b>FIGURE 3 : LES DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LA CELLULE DE REED-STERNBERG</b> .....	30
<b>FIGURE 4 : DEREGLATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DANS LA CELLULE DE REED- STERNBERG</b> .....	33
<b>FIGURE 5 : LES DIFFERENTES INTERACTIONS CELLULAIRES ENTRE LA CELLULE DE HRS ET LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.</b> .....	39
<b>FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA MPLA</b> .....	50
<b>FIGURE 7 : PROFIL D'EXPRESSION GENIQUE PAR RT-MLPA</b> .....	51
<b>FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA RT-MLPA COUPLEE AU SEQUENÇAGE NGS</b> .....	57
<b>FIGURE 9 : SURVIE GLOBALE (OS) ET SURVIE SANS PROGRESSION (PFS) DE LA COHORTE.</b> 66	
<b>FIGURE 10 : SURVIE GLOBALE (OS) ET SURVIE SANS PROGRESSION (PFS) DU GROUPE RR</b> 67	
<b>FIGURE 11 : EXPRESSIONS GENIQUES MOYENNES DES GENES ANALYSEES PAR RT-MLPA DANS LA COHORTE (N = 33) REPRESENTES SOUS FORME DE HEATMAP.</b> .....	72

<b>FIGURE 12 : EXPRESSION GENIQUE MOYENNE DES GENES MYC ET BCMA EN FONCTION DE LA REPOSE AU TRAITEMENT DE PREMIERE LIGNE .....</b>	<b>76</b>
<b>FIGURE 13 : COURBE ROC ET SURVIE GLOBALE (OS) EN FONCTION DE L'EXPRESSION GENIQUE DE <i>BCMA</i>.....</b>	<b>77</b>
<b>FIGURE 14 : COURBE ROC ET SURVIE SANS PROGRESSION (PFS) EN FONCTION DE L'EXPRESSION GENIQUE DE <i>BCMA</i>.....</b>	<b>78</b>
<b>FIGURE 15 : COURBE ROC ET SURVIE GLOBALE (OS) EN FONCTION DE L'EXPRESSION GENIQUE DE <i>MYC</i>.....</b>	<b>80</b>
<b>FIGURE 16 : COURBE ROC ET SURVIE SANS PROGRESSION (PFS) EN FONCTION DE L'EXPRESSION GENIQUE DE <i>MYC</i> .....</b>	<b>81</b>
<b>FIGURE 17 : ALGORITHME DE CLASSIFICATION.....</b>	<b>82</b>
<b>FIGURE 18 : INTERACTIONS ENTRE TACI, BCMA, APRIL ET BAFF AU SEIN DE LA CELLULE DE HRS.....</b>	<b>87</b>

## ABRÉVIATIONS

<b>ABF1:</b>	ARS Binding Factor 1
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc :</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>AP-1:</b>	Activator Protein 1
<b>APRIL</b>	A proliferation-inducing ligand
<b>ARN:</b>	Acide ribonucléique
<b>BAFF:</b>	B-cell Activating Factor
<b>BCL:</b>	B-cell lymphoma protein
<b>BCMA:</b>	B-cell Maturation Antigen
<b>BCR:</b>	B-cell receptor
<b>BOB1:</b>	BOBBER1
<b>CCL:</b>	(C-C motif) ligand
<b>C-FLIP:</b>	Cellular FADD-like interleukin 1B-converting enzyme inhibitory proteine
<b>CMH:</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CSFR1:</b>	Colony Stimulating Factor 1 Receptor
<b>CIITA:</b>	Class II major histocompatibility complex transactivator
<b>DDR2:</b>	Discoidin domain-containing receptor 2
<b>DISC:</b>	Death-inducing signaling complex
<b>DSS:</b>	Disease-Specific Survival
<b>EBER:</b>	EBV encoded RNA
<b>EBF:</b>	Early B cell factor
<b>EBNA1:</b>	EBV nuclear antigen 1
<b>EBV:</b>	Epstein-Barr Virus
<b>ECOG:</b>	Eastern Cooperative Oncology Group
<b>EFS:</b>	Event-Free Survival
<b>EORTIC:</b>	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
<b>ERK:</b>	Extracellular signal-regulated kinases
<b>FADD:</b>	Fas-associated protein with death domain
<b>FDG:</b>	18-fluorodéoxyglucose

<b>FFPE:</b>	Formalin Fixed Paraffin Embedded
<b>FISH:</b>	Fluorescent In Situ Hybridation
<b>FOXP3:</b>	Forkhead box P3
<b>GC:</b>	Centre Germinatif
<b>GEP:</b>	Gene Expression Profiling
<b>GHSB:</b>	German Hodgkin lymphoma Study Group
<b>HIS:</b>	Hybridation in situ
<b>HLA:</b>	Human leucocyte antigen
<b>HRS:</b>	Hodgkin Reed-Sternberg
<b>IFRT:</b>	Involved field radiotherapy
<b>Ig:</b>	Immunoglobuline
<b>IHC :</b>	Immunohistochimie
<b>IKK :</b>	I $\kappa$ B kinase
<b>IL :</b>	Interleukine
<b>IRF4 :</b>	Interferon regulatory factor 4
<b>JAK :</b>	Janus Kinase
<b>LBDGC :</b>	Lymphome B Diffus à Grandes Cellules
<b>LDH :</b>	Lactate déshydrogénase
<b>LFA-1 :</b>	Lymphocyte function-associated antigen 1
<b>LH :</b>	Lymphome de Hodgkin
<b>LHc :</b>	Lymphome de Hodgkin classique
<b>LMP1 et 2A :</b>	EBV latent membrane proteins 1 et 2A
<b>LYSA:</b>	The Lymphoma Study Association
<b>MAP:</b>	Mitogen-activated proteins kinases
<b>MLPA:</b>	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
<b>MUM1:</b>	Multiple Myeloma oncogene 1
<b>NF-<math>\kappa</math>B :</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>NK :</b>	Natural Killer
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>OS:</b>	Overall survival
<b>PAX5:</b>	Paired Box transcripteur factor 5

<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PD1:</b>	Programmed cell death 1
<b>PD-L1:</b>	Programmed death-ligand 1
<b>PD-L2 :</b>	Programmed death-ligand 2
<b>PDGFRA:</b>	Platelet-derived growth factor receptor A
<b>PFS:</b>	Progression-Free Survival
<b>PI3K:</b>	Phosphoinositide 3 kinase
<b>qRT-PCR :</b>	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
<b>RANK:</b>	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
<b>RC :</b>	Rémission complète
<b>RR :</b>	Rechute/Réfractaire
<b>RT-MLPA :</b>	Reverse Transcription Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
<b>RTK:</b>	Receptor tyrosine kinase
<b>SOCS1:</b>	Suppressor of cytokine signaling 1
<b>STAT:</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>TACI:</b>	Transmembrane activator and CAML interactor
<b>TEP :</b>	Tomographie par Emission de Positrons
<b>TGFβ :</b>	Transforming growth factor
<b>TMA:</b>	Tissue microarray
<b>TNF:</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TNFR:</b>	Tumor Necrosis Factor Receptor
<b>TRAF :</b>	TNF receptor associated factor
<b>VS :</b>	Vitesse de Sédimentation



# INTRODUCTION

Le lymphome de Hodgkin (LH) est l'un des lymphomes les plus fréquents. Il représente environ 0.5% de l'ensemble des cancers et 10% des nouveaux cas de lymphomes, avec une incidence annuelle de 2.6 cas pour 100 000 habitants et une mortalité de 0.3 pour 100 000 habitants. Le taux de survie globale à 5 ans est estimé à 86.4% (1). Il existe deux pics de fréquence, en effet la majorité des cas de LH sont diagnostiqués chez des patients âgés de 20 à 30 ans, avec un second pic d'incidence chez les adultes âgés de plus de 55 ans. Le LH se distingue des autres lymphomes par ses caractéristiques cliniques et histologiques, des schémas de traitement spécifiques, d'une grande chimio et radio sensibilité et d'un bon pronostic. Les complications à long terme, dont certaines sont la conséquence des traitements, ont depuis longtemps conduit à rechercher les conditions d'une décroissance thérapeutique ou d'une adaptation thérapeutique en fonction des facteurs pronostics initiaux. Cette stratégie repose actuellement sur l'adaptation des traitements à des facteurs pronostics initiaux et à la réponse précoce évaluée par tomographie par émission de positrons (TEP).

## I. Caractéristiques histologiques

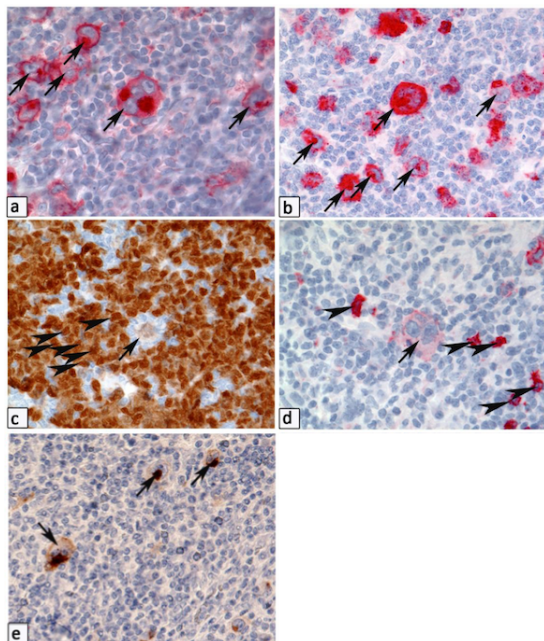
Le lymphome de Hodgkin se caractérise au plan histologique par la rareté des cellules tumorales qui ne représentent que 0.1 à 2% des cellules présentes dans la tumeur et par l'abondance des cellules réactionnelles du microenvironnement. Les cellules tumorales peuvent être mononuclées et sont alors appelées cellules de Hodgkin, ou plurinuclées appelées cellules de Reed Sternberg (HRS).

La classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) de 2008 révisée en 2016 (2) divise le lymphome de Hodgkin en deux entités : (i) le lymphome de Hodgkin classique (LHc) représentant 95% de l'ensemble des cas de LH ; (ii) le lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire, appelé également paragranelome de Poppema et Lennert dont les caractéristiques cliniques, histologiques et génétiques diffèrent du LHc. Dans ce travail nous nous sommes exclusivement intéressés au lymphome de Hodgkin classique.

Sur le plan immuno-phénotypique, la cellule de HRS exprime les antigènes habituellement présents dans les cellules lymphoïdes activées : le CD30, CD25, CD71, MUM1 (*Multiple Myeloma oncogene 1*), avec une absence de marqueurs myéloïdes à l'exception du CD15 dont l'expression est variable et typiquement une faible expression de PAX5 (*Paired Box transcription factor 5*). Il existe souvent une absence de marqueurs lymphoïdes spécifiques de lignées, en effet les marqueurs « B » CD20 et CD79a ne sont exprimés que dans 20 à 30% des cas et la cellule tumorale est presque constamment dépourvue d'immunoglobuline (Ig) de surface (3).

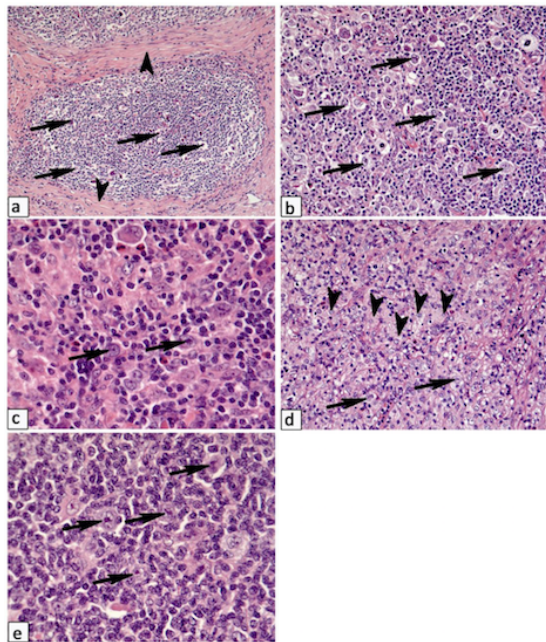
Sur le plan histologique le LHc est divisé en 4 sous types :

- **Scléro-nodulaire** : sous type le plus fréquent dans les pays occidentaux (environ 80% des cas), souvent chez les adolescents. Il présente souvent une atteinte médiastinale. Les cellules de HRS sont souvent EBV négatives. Il existe un infiltrat réactionnel fait de cellules épithéloïdes, de cellules T et un nombre variable de neutrophiles et d'éosinophiles.
- **Cellularité mixte** : 30% des cas de LHc. L'atteinte sous diaphragmatique et splénique est fréquente. Il touche plus fréquemment les enfants ou les sujets âgés immunodéprimés. Les cellules de HRS sont souvent EBV positives.
- **Déplétion lymphocytaire** : moins de 5% des cas, essentiellement chez les sujets âgés et immunodéprimés, notamment infectés par le VIH. Les cellules de HRS sont fréquemment EBV positives.
- **Prédominance lymphocytaire** : moins de 10% des cas, touchant plus particulièrement les sujets jeunes. L'atteinte ganglionnaire cervicale et de l'anneau de Waldayer est fréquente. De pronostic favorable, il présente souvent des stades localisés. Les cellules de HRS sont EBV positives dans 30 à 50% des cas.



**Figure 1 : Aspects immunohistochimiques du LHc**

(a) Expression de CD30 : membrane cytoplasmique et appareil de golgi (flèches). (b) Expression de CD15 : fort marquage membranaire (flèches). (c) Faible expression de PAX5 (flèches), expression plus forte de PAX5 au niveau des cellules B de la zone du manteau. (d) Faible expression de CD20 (flèches), les cellules B du microenvironnement présentent un fort marquage au CD20. (e) Expression de CD83 (marqueur T de cytotoxicité) (flèches).



**Figure 2 : Caractéristiques morphologiques des différents sous-types de LHc.**

(a) Sous type scléro-nodulaire : bande de sclérose et cellules lacunaires (flèches). (b) Cellules de Hodgkin Reed-Sternberg (flèches). (c) Cellularité mixte : infiltrat réactionnel de cellules épitheloïdes, lymphocytes et éosinophiles. (d) Cellularité mixte : abondant infiltrat d'histiocytes (tête de flèches), les cellules de HRS sont indiquées par des flèches. (e) Riche en lymphocytes : cellules de HRS (flèches) entourées par des cellules B du microenvironnement.

## II. Cellule d'origine

Le phénotype particulier des cellules de HRS avec la co-expression de différents marqueurs phénotypiques et l'absence de marqueurs « B » en immunohistochimie a longtemps rendu difficile l'identification de leur origine cellulaire qui demeura longtemps mystérieuse.

Les antigènes majeurs exprimés par les cellules tumorales sont le CD30, membre de la famille des récepteurs au TNF (*Tumor Necrosis Factor Receptor* (TNFR)) qui est constamment exprimé et le CD15, exprimé dans 75% des cas environ. Par ailleurs on note l'absence d'expression du CD45, marqueur commun des leucocytes, l'expression fréquente de PAX5, un marqueur spécifique de la lignée cellulaire B et qui peut dans certains cas être utile au diagnostic différentiel entre LHc et certains lymphomes T.

Les cellules de HRS peuvent exprimer différents autres marqueurs : marqueurs des cellules dendritiques (CCL17, fascine), des cellules « T » (granzyme B, perforine, CD3, CD4, NOTCH1, GATA3), des cellules « B » (CD20), des macrophages (alpha1-antitrypsine), des granulocytes (CD15), des cellules NK (*Natural Killer*) (ID2) et enfin des cellules myéloïdes (CSFR1).

Il existe dans la cellule tumorale une perte globale du phénotype B. Elle ne garde comme fonction lymphocytaire B que les fonctions de présentation d'antigène et les interactions avec les lymphocytes T CD4+.

La cellule de HRS est issue d'un lymphocyte B mature du centre germinatif (GC), ayant perdu secondairement son phénotype B et ayant échappé à l'apoptose. En effet l'étude par PCR (*Polymérase Chain Reaction*) des cellules de HRS obtenues par microdissection a démontré que la cellule de HRS présentait des réarrangements des gènes des Ig et des mutations hypersomatiques prouvant ainsi son origine B (4). Ceci suggère que le processus oncogénique est intervenu au moment ou après le passage dans le centre germinatif. En effet c'est dans le centre germinatif des follicules lymphoïdes que se produisent les évènements de mutations somatiques des gènes des immunoglobulines, dont le but est de sélectionner le récepteur B qui aura l'affinité idéale pour l'antigène. Les cellules de HRS subissent également dans la plupart des cas le phénomène de commutation de classe (5) ce qui constitue un argument de plus pour leur origine B. Néanmoins une faible proportion de cellules de HRS n'a pas de réarrangements des Ig et possède un phénotype T.

Par ailleurs il existe de nombreuses mutations somatiques dans les gènes des Ig des cellules de HRS (environ 25% des cas) les rendant non fonctionnelles, ces mutations sont pour la plupart des mutations non sens inactivatrices ou des délétions décalant le cadre de lecture aboutissant à une immunoglobuline non fonctionnelle (6)(7). Ces mutations surviennent également à l'état physiologique dans les cellules B du centre germinatif et entraînent l'apoptose des cellules B. Il est intéressant de constater que ces mutations inactivatrices surviennent essentiellement dans des cas de LHC EBV positifs, en effet le gène *LMPA2* (*EBV latent membrane proteins A2*) mime les signaux produits par le BCR (*B-cell receptor*) et permet ainsi aux cellules précurseurs HRS de survivre malgré un BCR défectueux suite aux mutations inactivatrices (8)(9).

### **III. Lymphomagenèse**

Le lymphome de Hodgkin est la conséquence d'une dérégulation de plusieurs fonctions biologiques. L'anergie lymphocytaire, la résistance à l'apoptose et l'amplification de plusieurs voies de signalisation, comme celle du facteur NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa B*) sont essentielles à la prolifération anormale et à la survie des cellules de HRS. Les cellules de HRS présentent également des lésions génétiques modifiant l'activité de facteurs de transcription. Enfin le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans les mécanismes de lymphomagenèse ainsi que dans l'échappement au système immunitaire, via la sécrétion de cytokines, la perte des molécules HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de classe II ou encore l'expression de PD-L1 (*Programmed Death-Ligand 1*).

#### **1. Voies de signalisation**

Plusieurs voies de signalisation sont dérégulées dans la cellule tumorale. Les causes de cette dérégulation sont multiples, les deux principales sont les boucles de rétrocontrôle paracrine et

autocrine et les lésions génétiques, entraînant des activations constitutives des voies de signalisation (**Figure 3**). Les principales voies de signalisation impliquées dans la lymphomagenèse sont :

#### a. La Voie NF- $\kappa$ B

C'est la voie la plus importante et la plus étudiée. NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription régulant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la réponse inflammatoire et l'apoptose. La dérégulation de cette voie est un mécanisme clé dans la physiopathogénie de plusieurs hémopathies lymphoïdes (10). L'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B altère la survie et la prolifération des lignées cellulaires de LH (11).

NF- $\kappa$ B se présente sous forme d'homo ou d'hétérodimères, composés des facteurs p50, p52, p65(RelA), c-Rel et RelB. Les protéines NF- $\kappa$ B sont inactivées de deux manières, soit elles sont séquestrées dans le cytoplasme grâce à l'action inhibitrice de I $\kappa$ B, soit elles sont directement synthétisées sous forme de précurseurs inactifs.

Il existe deux voies d'activation NF- $\kappa$ B, les deux sont présentes dans les cellules de HRS :

- **Voie canonique** : la stimulation du BCR ou des membres de la superfamille des TNFR (ex : le CD30 ou le CD40) active le complexe IKK (I $\kappa$ B kinase) . IKK phosphoryle I $\kappa$ B aboutissant à son ubiquitination et à sa dégradation via le protéasome, permettant ainsi la libération et la translocation nucléolaire de NF- $\kappa$ B p65/p50.
- **Voie alterne** : différents ligands se lient et stimulent leurs récepteurs : BAFF (*B cell activating factor*), TACI (*transmembrane activator and CAML interactor*), CD30, CD40 et RANK (*receptor activator of NF- $\kappa$ B*). La liaison des ligands à leurs récepteurs active IKK $\alpha$ , entraînant la dégradation protéasomique du précurseur p100 vers sa forme active p52, aboutissant ainsi à l'hétérodimérisation de p52/RelB et à sa translocation nucléolaire.

Une fois dans le nucléole, le complexe NF- $\kappa$ B régule la transcription de nombreux gènes cibles incluant les gènes des cytokines pro-inflammatoires (*IL6, IL13, TNF $\alpha$  et CCL5*), des facteurs anti-apoptotiques (*Bcl-xL, cIAP2, FLIP*), mais également des molécules d'adhérence, de prolifération et de survie cellulaire (12).

La voie NF- $\kappa$ B est activée de différentes manières dans le LH :

- Les cellules de HRS expriment de multiples membres de la famille des TNFR (CD30, CD40 et RANK). Les ligands de ces récepteurs sont exprimés par les cellules infiltrant le microenvironnement tumoral, ex : expression du CD40L par les cellules T, expression du CD30L par les mastocytes et les éosinophiles.

- D'autres facteurs contribuent à l'activation de cette voie comme Noct1(13), TACI et BCMA (*B-cell Maturation Antigen*) (14).
- Dans les cas EBV positifs, la molécule LMP1 recrute des protéines TRAF (*receptor associated factor*) mimant le CD40 et autres membres de la superfamille des TNFR (15).
- NF-κB interagit également avec d'autres facteurs de transcription tel que AP-1 (*Activator Proteine-1*). AP-1 stimule la prolifération des cellules de HRS et induit l'expression de gènes cibles tels que le *CD30* et *Galectine-1*(16).

#### **b. La voie JAK/STAT**

STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) est une famille de facteurs de transcription qui compte plusieurs membres dont certains sont fréquemment surexprimés dans la cellule de HRS (STAT3, STAT5 et STAT6) (17). Les cellules de HRS détournent les cellules du microenvironnement et modulent leur activité autocrine en exprimant différentes cytokines, chimiokines et récepteurs. Les cytokines se lient à leurs récepteurs et activent JAKs (*Janus Kinase*) qui phosphorylent STATs, entraînant leur dimérisation et leur translocation nucléolaire activant ainsi la transcription des gènes cibles.

Environ 25% des LHC ont une amplification du locus *JAK2* sur le chromosome 9p24 contribuant ainsi à l'activation de STATs dans les cellules de HRS (18). Dans les cellules de HRS, JAK2 agit en activant la signalisation STAT mais il est également impliqué dans la régulation épigénétique en phosphorylant l'histone H3. STATs activent l'expression du facteur suppresseur de cytokines SOCS1 (*suppressor of cytokine signaling 1*) qui régule négativement la signalisation des cytokines en phosphorylant JAK, entraînant la dégradation des facteur STATs via le protéasome (19).

#### **c. Les récepteurs à activité tyrosine kinase**

Plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase (PDGFRA, DDR2, EPHB1, RON, TRKA et TRKB) connus pour favoriser la prolifération cellulaire, sont exprimés de façon aberrante dans certains cas de LH. Les ligands de ces récepteurs se situent soit dans l'infiltrat inflammatoire du microenvironnement tumoral soit sont co-exprimés par la cellule de HRS elle même (20).

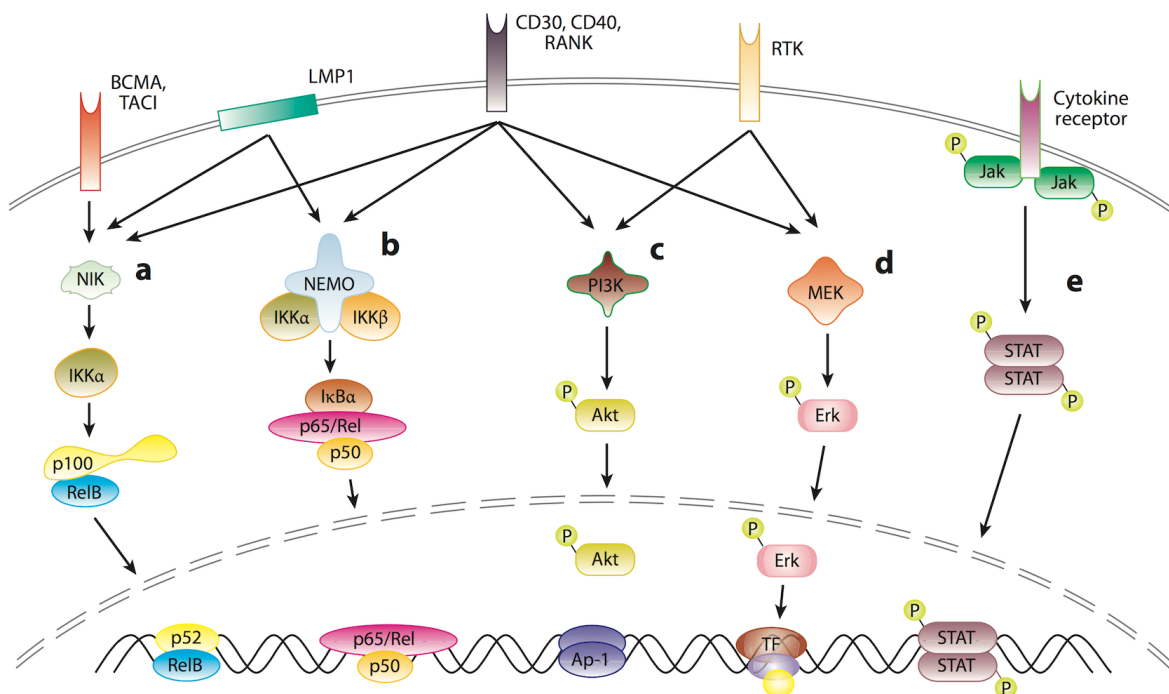
#### **d. La voie MAPK/ERK**

Les MAPKs (*mitogen-activated proteines kinases*) font partie de la famille des sérines-thréonines kinases. Ils reçoivent des signaux activateurs du milieu extracellulaire. Ces signaux régulent l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire. Plusieurs membres de cette voie sont présents à l'état actif dans les cellules de HRS (Erk-1/2 et Erk-5), par ailleurs l'inhibition de Erk dans des lignées de LH a des effets antiprolifératifs. L'activation de la voie MAPK/Erk dans les cellules de

HRS est également médiée par des membres de la famille des TNFR comme le CD30, CD40 et RANK (21).

### e. PI3K/AKT

PI3K (*phosphoinositide 3 kinase*) reçoit des signaux activateurs via le CD40, CD30, RANK et RTKs. Par ailleurs, la plupart des cellules de HRS contiennent des formes actives phosphorylées de Akt et des protéines cibles de Akt. L'inhibition de Akt dans des lignées cellulaires de LH aboutit à l'apoptose suggérant que la voie PI3K/Akt a un rôle essentiel dans la croissance et la survie des cellules de HRS (22)(23).



**Figure 3 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans la cellule de Reed-Sternberg**

D'après R.Schmitz et al (24). (a) Voie alterne : la liaison des ligands aux récepteurs BCMA, TACI, CD40 et RANK active la transduction du signal et aboutit à la translocation nucléaire de l'hétérodimère p52/RelB permettant ainsi la transcription des gènes cibles. (b) Voie canonique : les ligands activent les récepteurs CD30, CD40, RANK (en cas de cellules EBV+, la molécule LMP1 recrute des protéines TRAF mimant le membre de la famille TNFR), aboutissant à la translocation nucléaire de l'hétérodimère p65(RelA)/p50. la liaison des ligands aux récepteurs CD30, CD40, RANK et RTK active la cascade de signalisation des voies (c) PI3K/Akt et (d) MAPK/Erk. (e) La liaison des cytokines aux récepteurs active la voie JAK/STAT. Abréviations : BCMA, B cell maturation antigen ; IKK, inhibiteur kappa B kinase ; MAPK, mitogen activated protein kinase ; Erk, extracellular-related kinase ; NEMO, nuclear factor-kappa B essential modulator ; NIK, nuclear factor-kappa B – inducing kinase ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; RTK, receptor tyrosine kinase ; TACI, transmembrane activator and CAML interactor ; TF, transcription factor.

## 2. Facteurs de transcription

Il existe une dérégulation de nombreux facteurs de transcription intervenant dans les processus de différenciation et de survie cellulaire. La perte du phénotype B est le résultat de phénomènes épigénétiques (25) entraînant la perte d'expression (*silencing*) de facteurs de transcription clés de la différenciation cellulaire B associés à une activation de facteurs de transcription antagonistes (Figure 4).

### a. Facteurs de transcription spécifiques de la lignée « B » (Oct-2, Pu.1 et BOB1)

Il existe dans la cellule tumorale une diminution majeure voire une perte d'expression des facteurs transcriptionnels « B » des gènes des immunoglobulines tels que Oct-2 (*Octamer protein-2*), Pu.1 et BOB1(26)(27)

D'autres facteurs de transcription sont bien présents mais non fonctionnels :

### b. E2A et PAX5 :

E2A est un facteur de transcription régulant l'expression de plusieurs gènes spécifiques de lignée B tels que *CD19* et *CD79A*. Il est également essentiel au maintien de l'expression du programme génétique des cellules B matures. E2A est inactivé par ABF1 (*Activated B cell Factor 1*) et ID2 (facteur de transcription des cellules NK) qui sont anormalement exprimés dans les cellules de HRS. L'hétérodimère E2A/Id2 ne peut pas se lier à l'ADN contrairement à l'hétérodimère E2A/ABF1 qui se lie à l'ADN mais ne peut pas activer la transcription (28). Cette absence de fonction répressive, en plus de l'expression aberrante de *masters régulateurs* d'autres lignées, tels que le facteur de transcription T, NOTCH1 et le facteur ID2 des cellules NK, expliquent probablement l'expression de marqueurs myéloïdes ou lymphoïdes T.

PAX5 est un facteur de transcription d'engagement et de maintenance de la lignée B, il restreint le développement des progéniteurs lymphoïdes vers la lignée B. Il est exprimé dans les cellules de HRS mais n'active pas ses gènes cibles pour d'obscures raisons.

### c. EBF

EBF (*Early B cell factor*) est faiblement exprimé dans les cellules de HRS. Des études in-vitro ont démontré que l'expression de EBF dans des lignées cellulaires de LH activait le promoteur des gènes rapporteurs de CD19 et CD79a cotransfectés et non les gènes endogènes suggérant une répression de ces marqueurs B par des phénomènes épigénétiques (25).



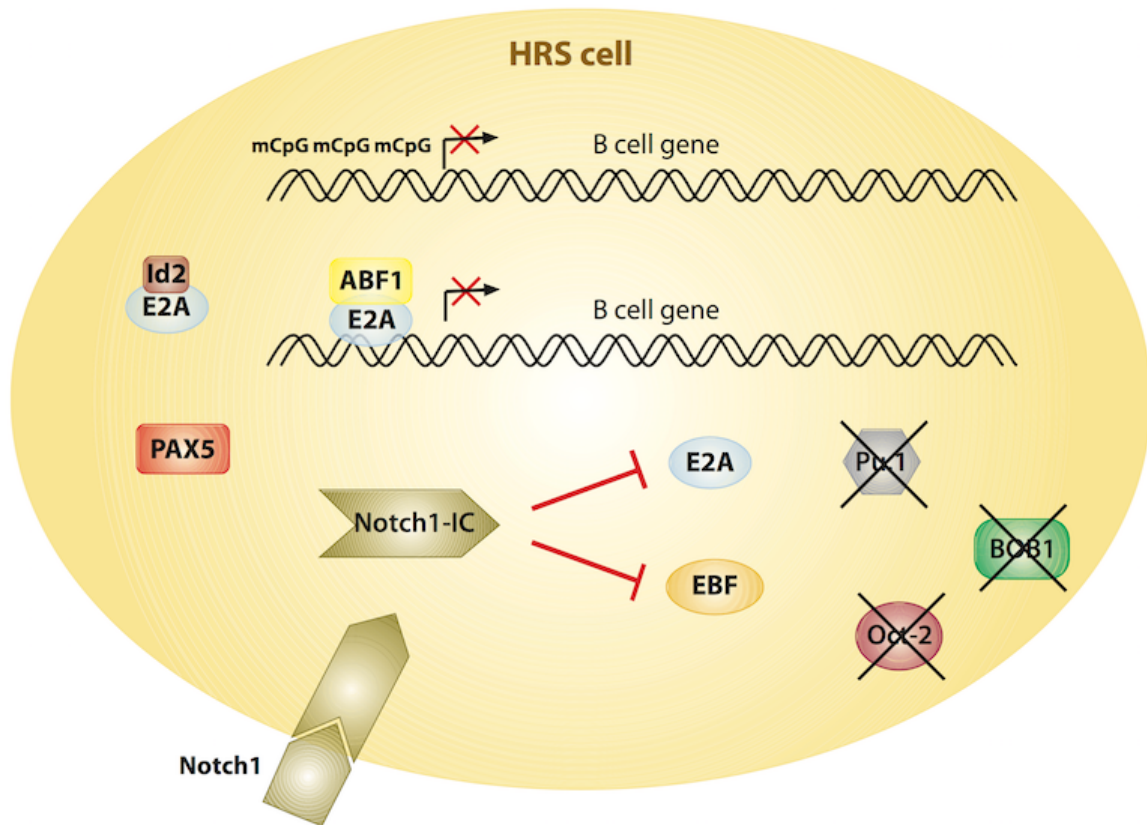
#### **d. NOTCH1**

NOTCH1 est un facteur de transcription suppresseur de la différenciation B et activateur du développement cellulaire T à partir de progéniteurs lymphoïdes (29). L'expression aberrante de ce *master régulateur* du développement cellulaire T dans les cellules de HRS contribue à la perte du phénotype B et à l'expression aberrante de nombreux marqueurs spécifiques de lignée T dans le LHc (30).

Les cellules de HRS subissent ainsi une reprogrammation drastique de leur programme génétique suite à des altérations de facteurs de transcription présents dans les cellules B normales. En effet plusieurs facteurs de transcription clés du développement cellulaire B sont sous exprimés comme Oct-2, Pu.1 et BOB1, alors que d'autres sont soit exprimés à des niveaux réduits comme EBF, soit inactivés comme E2A par l'expression aberrante d'inhibiteurs.

#### **e. Facteurs de transcription des cellules souches hématopoïétiques**

Il a récemment été démontré que les cellules de HRS exprimaient de manière aberrante des facteurs de transcription spécifiques des cellules souches hématopoïétiques (CSH) comme GATA-2, BMI-1, RYBP et EZH. Il existe ainsi des similitudes phénotypiques entre les cellules de HRS et les progéniteurs lymphoïdes dont la signification reste encore à élucider (24).



**Figure 4 : Dérégulation des facteurs de transcription dans la cellule de Reed-Sternberg**

D'après R.Schmitz, et al (24). Perte d'expression des facteurs spécifiques de lignée B : Oct-2, Pu.1 et BOB1. ABF1 et Id2 sont exprimés de manière aberrante dans la cellule de HRS et inactivent E2A : l'hétérodimère E2A-Id2 ne peut pas se lier à l'ADN alors que l'hétérodimère E2A-ABF1 se lie à l'ADN mais n'active pas la transcription des gènes cibles. Le récepteur NOTCH1 subit deux clivages protéolytiques aboutissant à la forme active intra-cellulaire NOTCH1-IC, NOTCH1-IC inhibe E2A et EBF. PAX5 est exprimé par la cellule HRS mais n'active pas ses gènes cibles. Des phénomènes épigénétiques aboutissent à la méthylation des promoteurs des gènes cibles et participent ainsi à la perte de l'expression des gènes spécifiques de lignées B.

### 3. Lésions génétiques

L'étude des anomalies génétiques est difficile du fait de la rareté des cellules de HRS et de leur faible index mitotique. L'étude des lésions génétiques se fait grâce à des techniques de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridation*) ou de PCR couplées à du séquençage sur des microdissections. Il existe une instabilité génomique majeure se traduisant par les caryotypes complexes des lignées cellulaires de LH et des cellules de HRS.

#### a. Translocations impliquant les chaînes lourdes ou légères des Ig :

Du fait de leur origine cellulaire B, il n'est pas rare de retrouver des translocations impliquant les gènes des chaînes lourdes et en faible proportion, les chaînes légères des Ig. Ces translocations sont détectées dans environ 20% des cas LHc (31). Les partenaires sont essentiellement BCL2, cycline D1

et MYC. BCL6 étant plus fréquemment impliqué dans le lymphome nodulaire à prédominance lymphocytaire. Dans la plupart des cas le partenaire est inconnu (32). L'extinction des loci des Ig dans les cellules de HRS soulève des questions, en effet on pourrait s'interroger sur l'importance des oncogènes dérégulés par ces translocations dans le clone cellulaire HRS définitif. Ces translocations sont essentielles aux cellules tumorales au stade précurseur, lorsqu'elles ont encore un phénotype B, mais par la suite elles perdent de leur importance du fait de phénomènes génétiques supplémentaires.

#### **b. Voie NF- $\kappa$ B**

- Gène *REL* : mutation gain de fonction ou amplification dans 50% des cas entraînant une augmentation du taux nucléaire de REL, contribuant ainsi à l'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B (33).
- Gènes *IkB $\alpha$*  et *IkB $\epsilon$*  : mutations somatiques inactivatrices de *IkB $\alpha$*  dans 10 à 20% des cas des LH et des mutations de *IkB $\epsilon$*  dans des lignées cellulaires. Ces gènes codent pour des inhibiteurs de la voie NF- $\kappa$ B et fonctionnent comme des gènes suppresseurs de tumeur (34)(35)(36).
- Gène *A20* : délétion chromosomique de la région 6q23 impliquant *A20*, mais également des mutations somatiques inactivatrices dans environ 45% des LHc (37).

#### **c. Voie JAK/STAT**

Il existe de nombreuses mutations perte de fonction du gène *SOCS1* (*Suppressor of cytokine signaling 1*) dans les cellules de HRS entraînant une activation constitutive de STAT dans le LH (38)(19). *SOCS1* étant le principal inhibiteur de STAT, il existe des mutations inactivatrices de *SOCS1* dans environ 40% des LHc. Le gène *JAK2* est fréquemment muté (39)(18). Par ailleurs les gains chromosomiques en 9p24.1 affectent le gène *JAK2* mais également les gènes *PDL1* et *PDL2* (*Programmed death-ligand*) (40).

#### **d. Récepteur Fas**

Les cellules de HRS expriment le récepteur Fas (tissus et lignées cellulaires de LH), mais dans les lignées cellulaires, les cellules de HRS sont largement résistantes à l'apoptose induite par la voie Fas (41). Il existe quelques mutations de *FAS* mais aucune mutations de *FADD* (*Fas-associated protein with death domain*), *Caspase 8* ou *Caspase 10* (42)(43)(44). Par ailleurs, les patients présentant des mutations germinales de *FAS* ont 50 fois plus de risque de développer un LH (45). Il est maintenant clairement établi que le phénotype de résistance des cellules de HRS à l'apoptose induite par Fas est secondaire à une surexpression de c-FLIP (*cellular FADD-like interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme*

*inhibitory protéine*), un inhibiteur de la voie Fas et que cette surexpression est médiée par la voie NF- $\kappa$ B (46)(47).

**e. Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)**

Des translocations impliquant *CIITA* (*class 2 major histocompatibility complex transactivator*) sont détectées dans environ 15% des cas de LHc. Le gène *CIITA* est fréquemment impliqué dans des translocations chromosomiques à l'origine d'une diminution de l'expression du CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité) (48). Ceci constitue un facteur de mauvais pronostic (49). Le gène de la B2-microglobuline (*B2M*), un composé du CMH I présente également des mutations inactivatrices (50).

GENE	TYPE DE LESIONS	REMARQUES	REFERENCES
<b>VOIE NF-<math>\kappa</math>B</b>			
<i>NFKBIA (IKB<math>\alpha</math>)</i>	Délétions, SNVs		(34)(35)
<i>NFKBIE (IKB<math>\epsilon</math>)</i>	Délétions, SNVs		(36)
<i>TNFAIP3 (A20)</i>	Délétions, SNVs	Fréquents dans les cas EBV(-)	(37)
<i>REL</i>	Gains		(33)
<i>MAP3K14</i>	Gains		(51)
<i>REL/BCL11A</i>	Gains, amplifications		(52)
<b>VOIE JAK/STAT</b>			
<i>SOCS1</i>	SNVs, délétions		(38)(19)
<i>JAK2</i>	Gains	Les gains chromosomiques en 9p24.1 affectent le gène <i>JAK2</i> mais également les gènes <i>PDL1</i> et <i>PDL2</i> (40)	(18) (39)
<b>PRESENTATION DE L'ANTIGENE</b>			
<i>CIITA</i>	Translocations		(48)(49)
<i>B2M</i>	SNVs, délétions		(50)
<i>CD58</i>	Délétions		(53)
<b>APOPTOSE</b>			
<i>FAS (CD95)</i>	SNVs, délétions		(44)

**Tableau 1 : Principales lésions génétiques dans la cellule de HRS**

SNV single nucleotides variants

#### 4. Apoptose

Les cellules de HRS expriment dans la majorité des cas le CD95 (Fas) à leur surface cellulaire mais sont résistantes à l'apoptose médiée par le CD95. A l'état normal, CD95 interagit avec son récepteur cD95L, entraînant la formation du complexe de mort cellulaire DISC (*death-induced signaling complex*) composé de FADD, caspase-8 et caspase-10. FADD est souvent surexprimé. Les patients présentant des mutations du gène *FAS* dans les syndromes lymphoprolifératifs auto-immuns (*autoimmune lymphoproliferative syndrome, ALPS*) ont sept fois plus de risque de développer un LH, alors que seulement 5% des cas de LH non associés à l'ALPS sont associés à des mutation de *FAS* (43). c-FLIP est une protéine anti-apoptotique, elle a une localisation essentiellement membranaire et inhibe l'apoptose en se liant à DISC. Elle est exprimée dans la majorité des cas de LHc (47). c-FLIP est un régulateur clé du mécanisme de résistance à l'apoptose dans les cellules de HRS, en effet l'inhibition de c-FLIP par des ARN oligonucléotidiques interférents est suffisante pour sensibiliser les cellules de HRS à l'apoptose induite par CD95.

#### 5. Microenvironnement tumoral

Les cellules de HRS recrutent de nombreux composants de l'infiltrat inflammatoire du microenvironnement tumoral via la sécrétion de cytokines et de chimiokines, à leur tour les cellules de HRS bénéficient de signaux paracrines produits par les cellules non tumorales du microenvironnement. Les cellules de HRS interagissent avec les cellules T CD4+ et CD8+, les cellules B, les plasmocytes, les macrophages, les mastocytes, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les éosinophiles et les fibroblastes (**Figure 5**).

Les interactions avec le microenvironnement tumoral sont nécessaires à la survie des cellules de HRS. Les cellules de HRS sont incapables de survivre chez des souris immunodéficientes (54) et il est difficile de générer des lignées cellulaires de HRS. En effet les quelques lignées cellulaires de LH disponibles, ont été générées à partir d'épanchements pleuraux, de sang périphérique et de moelle osseuse de patients réfractaires dont les cellules de HRS ont probablement perdu leur dépendance au microenvironnement suite à l'acquisition de mutations additionnelles ou à des phénomènes épigénétiques.

Les cellules T CD4+ constituent l'infiltrat cellulaire le plus important. Elles sont attirées par différentes chimiokines sécrétées par les cellules de HRS (CCL5, CCL17, CCL22) et par les fibroblastes (CCL11 (eotaxine) (55). Les cellules CD4+ *helper* (Th CD4+) sont souvent localisées à proximité immédiate des cellules de HRS et expriment le CD40L, permettant ainsi d'activer la signalisation CD40 dans les cellules de HRS (56). Le CMH de classe II et les molécules de co-stimulation, CD80 et CD86, exprimés à la surface des cellules de HRS favorisent les interactions avec

les cellules T. La proximité entre les cellules de HRS et les cellules T du microenvironnement est également favorisée par des molécules d'adhésion cellulaire exprimées soit à la surface des cellules de HRS, telles que le CD54 et le CD58, soit à la surface des cellules T CD4+, telles que LFA-1 et CD2.

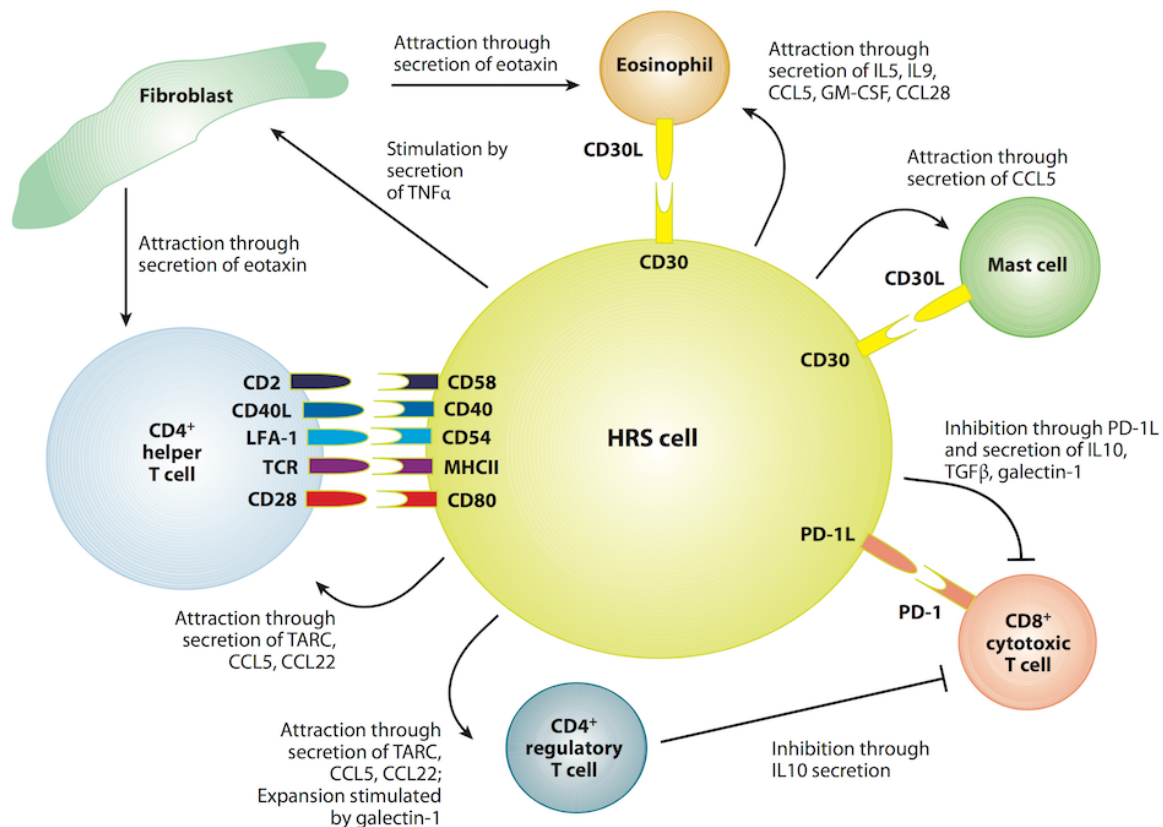
Les cellules T régulatrices (Treg) CD4+CD25+FOXP3+, en supprimant l'immunité cellulaire anti-tumorale, jouent également un rôle essentiel au sein du microenvironnement tumoral. Elles inhibent l'expression de l'IL2 et du CD25, empêchant ainsi l'activation des cellules T CD8+ cytotoxiques et NK. Elles secrètent également des molécules immunosuppressives telles que l'IL10. Tous ces effets concourent à protéger les cellules de HRS de l'activité cytotoxique des cellules T et NK, en particulier dans les LHC EBV positifs exprimant des antigènes viraux (57)(58).

Les cellules de HRS secrètent également le TGF $\beta$  (*Transforming growth factor  $\beta$* ) (59) et la Galectine-1. Ces molécules suppriment la réponse immunitaire (60). La Galectine-1 induit la mort cellulaire des cellules Th1, stimule l'expansion des cellules Treg et inhibe l'activité T cytotoxique anti-EBV.

Les cellules de HRS expriment également PDL-1 qui se lie et active PD1 au niveau des cellules T et inhibe ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale (61).

Les éosinophiles sont recrutés dans le microenvironnement grâce à la sécrétion de l'IL5, IL9, CCL5, CCL28 et du *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* par les cellules de HRS, et du CCL11 par les fibroblastes (62). Les éosinophiles secrètent le TGF $\beta$  et expriment le CD30L stimulant ainsi la signalisation CD30 dans les cellules de HRS.

La sécrétion de CCL5 par les cellules de HRS attire également les mastocytes au sein du microenvironnement tumoral, les mastocytes expriment également le CD30L. Ils contribuent également à la croissance tumorale en stimulant l'angiogenèse et le remodelage tissulaire.



**Figure 5 : Les différentes interactions cellulaires entre la cellule de HRS et le microenvironnement tumoral.**

D'après R.Schmitz, et al (24). Les fibroblastes secrètent des éotaxines qui attirent les cellules T CD4+ et les éosinophiles. La cellule de HRS reçoit des signaux de survie provenant des éosinophiles et des mastocytes via la signalisation CD30-CD30L. La cellule de HRS reçoit de nombreux signaux prolifératifs en provenance des cellules Th CD4+ : CD2-CD58, CD40-CD40L, CD54-LFA-1, MHCII-TCR, CD80-CD28. Les cellules T CD8+ cytotoxiques sont inhibées de différentes manières : (i) interaction PD1-PD-L1 entre les cellules T CD8+ et les cellules HRS, (ii) sécrétion de TGFβ, galectine-1 et IL10 par les cellules HRS, (iii) action des Treg qui secrètent également l'IL-10.

## 6. Rôle du virus EBV

Dans environ 40% des cas de LHc, les cellules de HRS présentent une infection latente à l'EBV (63). Les cellules de HRS sont infectées de manière clonale suggérant que l'infection est un évènement précoce dans la pathogenèse. Les cellules de HRS expriment alors EBER (*EBV encoded RNA*) qui est l'ARN viral non codant, EBNA1 (*EBV nuclear antigen 1*) et LMP1 et 2A (*EBV latent membrane proteins 1 et 2A*). EBNA1 est essentiel à la réplication du génome épisomal de l'EBV dans les cellules. LMP1 mime un récepteur CD40 actif, molécule de costimulation des cellules B (64). LMPA2 mime le BCR. Le CD40 et le BCR sont deux molécules essentielles à la sélection et à la survie des cellules B du centre germinatif. LMP1 et LMPA2 « sauvent » ainsi les cellules précurseurs de HRS déficientes en BCR de l'apoptose en mimant ces deux signaux. Il est intéressant de constater que tous



les cas de LH ayant des mutations inactivatrices du BCR sont EBV positifs confirmant le rôle essentiel de l'infection EBV(65).

## **7. Cytokines**

La cellule de HRS secrète de nombreuses cytokines : (IL)-5, -6, -9, -10 et 13 (66). L'IL-13 et son récepteur l'IL-13R $\alpha$ 1 sont fortement exprimés dans les lignées cellulaires de HRS (67). L'IL-13 stimule la différenciation des T *helper* en Th2 et peut ainsi indirectement promouvoir l'immunosuppression et influencer sur la survie et/ou la prolifération des cellules B en se liant à son récepteur et en activant STAT6 (68). L'expression de plusieurs facteurs de transcription y compris GATA-3 et T-Bet dirige la production, par les cellules T de cytokines de type Th1 et Th2 (69).

#### IV. Présentation clinique et évaluation pré-thérapeutique

Le LHC est le plus souvent révélé par une adénopathie périphérique. Dans 60 à 80% des cas, il s'agit d'adénopathies cervicales basses ou sus-claviculaires. L'atteinte médiastinale est présente dans 60% des cas lors du diagnostic et peut être découverte à l'occasion d'une radiographie thoracique réalisée de manière systématique ou dans le cadre d'un bilan pour des symptômes tels que la toux, la dyspnée ou une douleur. Des signes généraux tels qu'une fièvre persistante sans cause apparente, des sueurs nocturnes ou un amaigrissement, peuvent précéder l'apparition d'adénopathies périphériques. Il peut également y avoir un prurit inexplicé ou des douleurs survenant quelques minutes après l'ingestion d'alcool au niveau d'une atteinte osseuse ou ganglionnaire.

Le diagnostic nécessite une biopsie ganglionnaire réalisant l'exérèse complète d'une adénopathie. En l'absence d'adénopathie périphérique, la biopsie d'une masse médiastinale, d'une atteinte extra ganglionnaire ou une biopsie médullaire permet le diagnostic.

Une fois le diagnostic établi, une évaluation pré-thérapeutique est réalisée permettant un classement en stades selon la classification de Ann Arbor modifiée selon *Costwolds* (70) (**Annexe 1**), complétée par l'évaluation des facteurs pronostics, permettant ainsi de définir des groupes pronostics. Cette évaluation pré-thérapeutique comporte un interrogatoire et un examen clinique rigoureux, un bilan biologique avec un hémogramme, une VS (vitesse de sédimentation), le taux sérique de LDH (lactate déshydrogénase), un bilan hépatique, un ionogramme sanguin et une créatininémie, ainsi que des examens d'imagerie avec un scanner thoraco-abdomino-pelvien et surtout une tomographie par émission de positrons au 18-fluorodéoxyglucose (TEP-FDG) qui reste l'examen de choix dans l'évaluation pré-thérapeutique mais également lors du suivi de la réponse au traitement. La stratification des patients en groupes pronostics est essentielle à l'adaptation des schémas thérapeutiques, afin d'améliorer la survie des patients sans rechute tout en limitant la survenue d'effets secondaires liés à la toxicité retardée des traitements chez des patients souvent jeunes.

Les stades localisés sont caractérisés par un excellent pronostic avec des taux de survie supérieurs à 90%. Les facteurs de risque des groupes coopérateurs LYSA/EORTIC (*The Lymphoma Study Association / European Organisation for Research and Treatment of Cancer*) (71) les classent en stades localisés favorables ou défavorables et prennent en compte l'âge, la VS, l'index médiastino-thoracique et le nombre d'aires ganglionnaires atteintes (**Annexe 2**).

Les stades avancés ont un moins bon pronostic avec un taux survie globale de l'ordre de 75 à 90%. Le score IPS (*International Prognosis Score*) (**Annexe 4**) est utilisé et prend en compte l'âge (> 45ans), le sexe masculin, l'albumine (< 40g/l), l'hémoglobine (<10.5g/dl), le stade IV, l'hyperleucocytose (>15 x 10<sup>9</sup>/L) et la lymphopénie (< 0.6 x 10<sup>9</sup>/L) (72).

Il est à noter que la définition de LH de stades avancés diffère selon les groupes coopérateurs. Les stades avancés III et IV selon la classification de Ann Arbor modifiée selon *Costwolds* y sont toujours intégrés, mais certains groupes y ajoutent les stades IIB avec volumineuse masse médiastinale et/ou atteinte extra-nodale, voire parfois tous les stades IIB. Ces différences de stratification sont à prendre en compte dans l'interprétation des résultats des différentes études. Nous prendrons ici pour exemple la classification du groupe allemand GHSG (*German Hodgkin lymphoma Study Group*), qui intègre les stades IIB avec bulk médiastinal ou atteinte extra-nodale dans les formes disséminées (**Annexe 3**).

Les stratégies guidées par la TEP avec une évaluation intermédiaire de la chimio sensibilité sont entrain de modifier la stratification pronostique des LHc, en effet la TEP réalisée à deux cycles est prédictive de la survie sans progression à deux ans quelque soit le score IPS initial (73).

## V. Traitement

L'objectif du traitement est d'obtenir un meilleur contrôle de la maladie au prix d'une moindre toxicité afin d'éviter les complications à court terme mais également à moyen et long terme.

Le traitement des stades localisés est basé sur un traitement combiné associant chimiothérapie et radiothérapie. La chimiothérapie de référence depuis les années quatre-vingt est l'ABVD (Doxorubicine, Bléomycine, Vinblastine et Dacarbazine). Pour les stades localisés favorables, le standard est le traitement combiné associant trois cycles d'ABVD et radiothérapie à la dose de 30 Gy sur les aires ganglionnaires initialement atteintes (*Involved Field Radiotherapy (IFRT)*) (74). Le GHSG a examiné la possibilité de réduire la chimiothérapie de quatre à deux cycles et/ou l'irradiation localisée de 30 à 20 Gy. Cette approche semble prometteuse, en effet l'étude HD10 a comparé quatre schémas thérapeutiques : quatre ou deux cycles d'ABVD suivis d'une irradiation à 30 Gy, quatre ou deux cycles d'ABVD suivis d'une irradiation à 20 Gy. Il n'y avait pas de différence en terme survie globale ou du taux d'échec au traitement, en revanche il y avait plus d'évènements toxiques dans les groupes de patients recevant quatre cycles d'ABVD et 30 Gy (74).

Pour les stades localisés défavorables, le standard est quatre cycles d'ABVD suivis d'une radiothérapie à la dose de 30 Gy IFRT (76).

L'objectif est de diminuer la toxicité dans les formes favorables et d'obtenir un meilleur contrôle de la maladie dans les formes défavorables. Comme il a déjà été mentionné auparavant, la TEP-FDG a un rôle essentiel lors du diagnostic initial et de l'évaluation de la réponse en fin de traitement, mais aucune stratégie guidée par la TEP intermédiaire n'est validée dans les stades localisés en dehors d'un essai clinique.

L'évaluation de la réponse au traitement se fait, selon les recommandations du LYSA, avant la radiothérapie et après les cycles d'ABVD (77). Le patient est réfractaire primaire si la maladie progresse sous traitement ou dans les trois mois après la fin du traitement ou s'il persiste une masse résiduelle au TEP-FDG (score 4 ou 5 sur l'échelle de Deauville) (78) (**Annexe 5**), associé à une adénopathie significative au scanner. Au moindre doute une documentation histologique est nécessaire (79).

Le traitement des formes avancées est basé sur la chimiothérapie seule. Deux schémas existent, l'ABVD, six à huit cycles sont recommandés avec un taux de survie sans progression à 5 ans de 68 à 76% et un taux de survie globale jusqu'à 88% à 5 ans (80). Cependant le contrôle de la maladie reste insuffisant pour environ 25 à 30% des patients et il existe une toxicité hématologique mais surtout pulmonaire non négligeable qui reste hétérogène selon les essais (81). Le deuxième schéma thérapeutique est le BEACOPP escaladé (Bléomycine, Etoposide, Doxorubicine, Cyclophosphamide, Vincristine, Procarbazine et Prednisone). L'essai HD9 a bien démontré la supériorité de huit cycles de BEACOPPesc sur huit cycles de COPP/ABVD en terme de survie globale et de survie sans échec à 10 ans (82). En comparaison à l'ABVD, le BEACOPPesc permet un meilleur contrôle de la maladie avec une meilleure survie sans progression mais sans bénéfice en terme de survie globale (probablement dû à l'efficacité des traitements de rattrapage). Le BEACOPPesc s'associe à une toxicité immédiate hématologique non négligeable mais également tardive avec risque d'infertilité mais également de cancers secondaires (tumeurs solides, syndromes myélodysplasiques et leucémies aiguës). L'étude HD15 a cependant démontré un bénéfice en terme de survie globale et de diminution des toxicités avec six cycles au lieu de huit (83). En conclusion les deux traitements de référence ne présentent pas de différence en terme de survie globale, mais il est important d'identifier les patients à risque de résistance ou de rechute dès la prise en charge initiale.

Actuellement il existe deux stratégies thérapeutiques dans les stades avancés, l'escalade ou la désescalade thérapeutique selon les résultats de la TEP-FDG réalisée précocement. L'essai AHL 2011 du LYSA est une étude de non infériorité qui compare la poursuite du traitement par quatre cycles d'ABVD pour les patients ayant une TEP-FDG négative après deux cycles de BEACOPPesc, à six cycles de BEACOPPesc. L'analyse intermédiaire a retrouvé une survie globale et une survie sans progression identique dans les deux groupes avec un taux de toxicité de grade 3 supérieur dans le groupe BEACOPPesc. Ainsi les patients avec une réponse rapide initiale après deux cycles de chimiothérapie, évaluée par une TEP-FDG négative peuvent bénéficier d'une désescalade d'intensité et de ce fait d'une réduction de la toxicité chimio-induite.

### **Particularités du sujet âgé (>60ans) :**

Il existe un 2<sup>ème</sup> pic de fréquence dans le LH, survenant chez les sujets âgés (> 60ans) et représentant 20% des LH. L'âge à lui seul est un facteur de risque péjoratif. S'y ajoutent les comorbidités et une tolérance réduite des traitements. Les études sont peu nombreuses mais elles semblent toutefois montrer de moins bons résultats que chez les sujets jeunes. En effet avec les traitements standards type ABVD se pose la question de la tolérance de la Doxorubicine et de la Bléomycine (84). Dans une série de 95 patients âgés (âge médian de 67 ans) de stades avancés, traités par ABVD, les taux de survie globale et de survie sans progression à 5 ans étaient de 58% et 44%. Il y avait 6% de décès toxiques dont 25% secondaires à la toxicité de la Bléomycine (85). Des protocoles alternatifs ont été proposés par les groupes coopérateurs. L'essai du GHSG a évalué, chez 59 patients, le protocole PVAG : Prednisone, Vinblastine, Doxorubicine et Gemcitabine. Les taux de survie globale et de survie sans progression à 3 ans étaient respectivement de 58% et 66%, et il y avait un seul décès toxique (86). Une étude prospective de phase II du LYSA : PVAB évalue l'efficacité de la Bendamustine en association à la Prednisone, Vinblastine et Doxorubicine. Les inclusions sont toujours en cours.

L'enjeu majeur de la prise en charge thérapeutique du LHc est l'identification précoce des patients à risque de résistance au traitement de première ligne afin d'adapter au mieux le traitement. A l'heure actuelle, il existe peu de facteurs pronostics cliniques ou biologiques permettant d'identifier ces patients à risque.

## **VI. Les nouveaux marqueurs pronostics : les biomarqueurs**

### **1. Etude du profil d'expression génique ou *Gene Expression Profiling* (GEP)**

#### **Principe**

L'étude du profil d'expression génique ou *gene expression profiling* (GEP) de l'ensemble du tissu tumoral a permis d'introduire une nouvelle approche dans l'étude des biomarqueurs. Les études de GEP ont permis de développer des modèles pronostics basés sur l'expression génique. Ces modèles ont pour but d'identifier, dès la prise en charge initiale, les patients susceptibles de résister au traitement de première ligne. La mesure des niveaux d'expression génique au sein du transcriptome a permis de mettre en évidence des signatures moléculaires associées à la réponse initiale au traitement. A la différence des lymphomes non hodgkiniens et autres cancers solides, où le profil d'expression génique des tissus tumoraux reflète celui des cellules tumorales, le tissu tumoral dans le LHc est essentiellement constitué de cellules non tumorales du microenvironnement, ainsi le profil

d'expression génique dans le LHC reflètera la composition variable des cellules du microenvironnement tumoral.

Les études de GEP sont basées sur le pouvoir pronostic de gènes, soit à l'échelle individuelle moléculaire, soit à l'échelle de « *cluster* » ou de « signature moléculaire ». Cela nécessite dans un premier temps, la sélection de signatures d'expression génique pertinentes décrites dans la littérature, puis dans un second temps, la quantification du niveau d'expression d'ARNm extrait à partir de tissus tumoraux, soit frais congelés, soit inclus en paraffine (Formalin Fixed, Paraffin Embedded, FFPE). Le but est d'établir un score moléculaire prédictif de résistance et/ou de rechute, applicable en routine dès la prise en charge initiale du patient et d'identifier ainsi des sous-groupes pronostics. Les différentes étapes peuvent être ainsi résumées :

1. Sélection des gènes.
2. Sélection d'une cohorte *training* et d'une cohorte de validation.
3. Extraction de l'ARNm à partir d'échantillons tumoraux et analyse du GEP.
4. Sélection d'un nombre de gènes pour validation à l'échelle protéique par immunohistochimie (IHC) dans une cohorte indépendante de validation.
5. Analyse de biostatistique

#### **Essais basés sur la PCR en temps réel**

L'étude pionnière est celle de *Devillard et al* en 2002 (87). En utilisant des puces à ADN (*micro-arrays*), l'équipe a pu analyser le niveau d'expression d'environ 1000 gènes à partir de 21 biopsies au diagnostic ou la rechute de 20 patients (stades avancés ou localisés). Malgré le faible nombre d'échantillons, l'hétérogénéité des biopsies et l'absence de cohorte de validation, rendant les résultats de cette étude difficiles à interpréter, cette étude a apporté la notion que le profil d'expression génique contenait des signaux du microenvironnement tumoral pouvant être utilisés pour prédire la réponse au traitement. L'étude a démontré pour la première fois la faisabilité du *profiling* d'échantillons de biopsies de LHC en utilisant des puces à ADN, l'hétérogénéité transcriptionnelle et ainsi l'établissement d'une corrélation entre profil d'expression génique et pronostic.

Par la suite trois équipes se sont intéressées à la réponse tumorale après un traitement de première ligne en analysant des biopsies réalisées au diagnostic.

En 2006 l'équipe de *Sanchez-Aguilera* (88) a étudié 29 biopsies de patients de stades avancés III/IV, recevant un traitement standard type ABVD ou similaire (*ABVD-like*). La réponse au traitement a été classée en deux groupes : réponse favorable (rémission complète maintenue au delà de 12 mois), et réponse défavorable (absence de rémission, progression ou courte période avant rechute). La cohorte était intentionnellement biaisée avec sélection de 14 patients dans le groupe favorable et 15 patients dans le groupe défavorable. L'étude a permis l'identification de 145 gènes pertinents, classés en quatre

groupes de signatures moléculaires : **(1)** Signature « T » (*CD8B1, CD3D, CD26, SH2D1A*), macrophages (*ALDH1A1, LYZ, STAT1*) et cellules dendritiques plasmacytoïdes (*ITM2A*). Cette signature était surexprimée dans le groupe défavorable. **(2)** Groupe hétérogène de gènes impliqués dans l'adhésion et le remodelage de la matrice extracellulaire (*TIMP4, SPON1, LAMB1*), des gènes impliqués dans la fonction des fibroblastes et le chimiotactisme (*TACRI, CCL26*) et des molécules exprimées par les cellules présentatrices d'antigène (*CRI, HLA-DRB3*) et par certaines cellules B (*RTA2, VDR*). Cette signature était surexprimée dans le groupe favorable. **(3)** et **(4)** Signatures surexprimées dans le groupe défavorable : **(3)** Groupe de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose (*CYCS, CASP14, HSPAIL*), la transduction du signal (*PDCD10, PRKACB*), le métabolisme et la croissance cellulaire (*COX7A2, MYCN, DCK*), **(4)** Gènes codant les protéines régulatrices du cycle cellulaire (*MAD2L1, BUB1, STK6, CDC2, CHEK1*). La signature moléculaire « macrophage » dans le groupe défavorable a été validée dans une cohorte de 235 patients par immunohistochimie pour STAT1 et ALDH1A1.

La deuxième étude est celle de *Steidl et al* en 2010 (89) qui ont également identifié une signature « *Tumor Associated Macrophage* » associée à un échec au traitement de première ligne, en étudiant 130 échantillons de patients atteints de LHc au diagnostic (stades localisés et avancés). Les résultats ont été validés dans une cohorte de 166 patients par IHC. A l'instar de *Sanchez-Aguilera*, *Steidl* a également utilisé une approche d'enrichissement de la cohorte avec des patients en rechute et/ou réfractaires.

La troisième étude est celle de *Chetaille et al* en 2009 (90) portant sur 63 échantillons de patients atteints de LHc. Une signature cellulaire B associée à un meilleur pronostic a été identifiée. Les résultats ont été validés par IHC dans une cohorte indépendante de 146 patients.

D'un point de vue moléculaire, à l'échelle individuelle les résultats de ces trois études diffèrent énormément, en effet les profils d'expression génique retrouvent des listes de gènes pertinents différentes, ces différences peuvent être expliquées par : la sélection des cohortes, le nombre variable d'échantillons, les tests statistiques utilisés et les plateformes de *microarrays*. En revanche, si l'on classe ces gènes en groupes de « signature moléculaire » reflétant des processus biologiques, on retrouve plus de similitude.

Par la suite en 2010 *Sanchez-Aguilera* (91) a établi un score moléculaire d'échec au traitement basé sur 11 gènes. A partir des résultats de deux études précédentes du même laboratoire, obtenus à partir de deux cohortes indépendantes de 29 (88) et 52 (92) patients de stade avancés, ils ont pu sélectionner des gènes exprimés par le microenvironnement tumoral et les cellules de HRS chez les patients du groupe défavorable. Ces gènes ont été sélectionnés car ils possèdent une fonction biologique pertinente dans la pathogénèse du LHc, et ils ont un intérêt pronostic. En ré-analysant les données de

GEP des précédentes études et en utilisant des données de bioinformatique, ils ont pu identifier 56 gènes. L'expression de certains de ces gènes a été validée à l'échelle protéique par IHC. L'intérêt pronostic des 56 gènes a été testé sur 56 échantillons FFPE de patients par qRT-PCR (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) (92), ce qui a permis de sélectionner 30 gènes. Ces 30 gènes ont été testés dans une cohorte de validation indépendante de 282 échantillons FFPE de patients de stade avancé traités par ABVD ou *ABVD-like* (91), le but était d'établir un score moléculaire prédictif d'échec au traitement. L'expression des gènes a été analysée par *TaqMan low density assay technology*. Au final 11 gènes ont été identifiés, divisés en quatre voies de signalisation fonctionnelles : cycle cellulaire, apoptose, activation macrophagique et IRF4 (*interferon regulatory factor 4*). Ce score permet d'identifier les patients à haut risque et bas risque avec des différences en terme de survie sans rechute à 5 ans.

### **Essais basés sur la technologie Nanostring**

L'équipe de *W. Scott* en 2013 (93) a utilisé une approche qui intègre une multitude de gènes, décrits précédemment dans la littérature comme ayant un rôle pronostic. Au total 259 gènes ont été analysés en utilisant la plateforme Nanostring qui permet d'analyser le niveau d'expression de plusieurs gènes en une seule réaction. Ils ont pu ainsi construire un modèle prédictif à partir d'échantillons FFPE de 290 patients atteints de LHC de stade avancé (cohorte de l'intergroup phase 3 randomized controlled trial E249 comparant l'ABVD au Stanford V). Un modèle prédictif de survie globale à 23 gènes a été établi avec la définition d'un score seuil dans la cohorte permettant de séparer les patients en « haut risque » et « bas risque ». Ce score a été validé dans une cohorte indépendante de 78 patients, enrichie en patients en échec. Le modèle a pu ainsi identifier dans la cohorte de validation deux groupes pronostics, groupe à « haut risque » et groupe à « bas risque », avec des différences en terme du taux de survie globale (63% vs 92%,  $p < 0.001$ ) et de survie sans progression (59% vs 82%,  $p = 0.04$ ) et ce indépendamment de l'IPS, de l'âge > 45ans et du statut CD68 en IHC.

### **Microdissection**

Les techniques de microdissection ont permis d'étudier les cellules de HRS séparément du microenvironnement tumoral (études du *copy number*, études de GEP et analyse mutationnelle de gènes cibles). L'équipe de *Randy D Gascoyne* en 2012 (94) a étudié 29 biopsies ganglionnaires de LHC et 5 lignées cellulaires de LH par *GeneChip (microarray)*. En comparant les profils d'expression génique dans les groupes réfractaires et répondeurs, les auteurs ont pu déterminer une « signature macrophage » dans le groupe échec au traitement de première ligne avec expression du gène *CSF1R*, ainsi qu'une sous expression des marqueurs de lignées B (*CD19 CD20 CD79a* et *CD79b*) et une dérégulation des facteurs de transcription transactivateurs des gènes impliqués dans les voies de signalisation JAK/STAT et NF- $\kappa$ B, mais également des chimiokines et cytokines.



**Tableau 2 : Principales études de GEP dans le LH**

Références	Année Revue	Echantillons	Contrôles	Technique Nombre de gènes	Signature moléculaire	Association	Cohorte de validation	Analyse multivariée
<b>E. Devillard et al (87)</b>	2002 Oncogene	21, stades avancés et localisés	Lignées cellulaires : LH (L-428, KM-H2, HDLM-2) et non LH Tissus : adénopathies, lymphomes	Microarray « Maison » ADNc ~ 1000 gènes	Fibroblastes. Régulation positive de l'apoptose. Voies de signalisation : cytokines et leurs récepteurs, transduction du signal. Réparation de l'ADN ( <i>PMS2</i> ), gène suppresseur de tumeur ( <i>PTEN</i> , <i>NOTCH</i> ).	Réponse au traitement, rémission complète	Non	non
<b>A.Sanchez-Aguilera et al (88)</b>	2006 Blood	29, stades avancés	Adénopathies réactionnelles, lignées cellulaires : LH (L-428, KM-H2, HDLM-2, L1236, L540), centroblastes	Microarray OncoChip cDNA microarray (CNIO) ADNc ~ 9348	145 gènes : Cellules « T ». Macrophages et cellules dendritiques plamacytoïdes. Matrice extracellulaire. Fibroblastes. Cellules présentatrices de l'antigène. Cellules B. Apoptose. Transduction du signal. Métabolisme et croissance cellulaire. Cycle cellulaire.	Réponse au traitement, rémission complète	235 patients IHC, TMA	non
<b>B.Chetaille et al (90)</b>	2009 Blood	63, stades avancés et localisés	Lignées cellulaires : LH (L-428, KM-H2, HDLM-2), fibroblastes (HFFB), cellules endothéliales (HUVEC) Lymphomes B riche en T	Microarray Affymetrix Oligonucleotides ~ 16000 gènes	17 clusters : Cycle cellulaire. Signalisation interféron et réponse antiviral. Métabolisme cellulaire, Matrice extracellulaire. Cellules « B », plasmocytes. Apoptose. Histiocytes/cellules T/réponse immunitaires innée. Cellules Reed-Sternberg	Réponse au traitement, rémission complète	146 patients IHC et TMA	EFS, OS
<b>C.Steidl et al (89)</b>	2010 N Engl J Med	130, stades localisés et avancés	non	GeneChip Human Genome (Affymetrix) Oligonucleotides ~ 25000 gènes	Réponse immunitaire cellulaire. Signalisation cellulaire. Signalisation IL-12. Macrophage. Apoptose. Signalisation CTLA4. Lymphocytes « T » cytotoxiques. Monocytes. Angiogenèse. Adipocytes. Cellules Reed-Sternberg. Cellules B du centre germinatif.	Echec au traitement de 1 <sup>ère</sup> ligne	166 patients IHC et TMA	PFS, DSS
<b>B.Sanchez-Espiridion (91)</b>	2010 Blood	183, stades avancés	non	TaqMan low-density array (Applied Biosystems)	11 gènes : Cycle cellulaire ( <i>HMMR</i> , <i>CENPF</i> , <i>CCNA2</i> , <i>CCNE2</i> , <i>CDC2</i> ), apoptose ( <i>BCL2</i> , <i>BCL2L1</i> , <i>CASP3</i> ), activation macrophagique ( <i>LYZ</i> , <i>STAT1</i> ) et IRF4	Réponse au traitement de première ligne	79 patients	FFS
<b>Steidl C (94)</b>	2012 Blood	29, stades avancés et localisés	Lignées cellulaires LH (L-428, KM-H2, HDLM-2, L1236, L540) Microdissection	GeneChip arrays (Affymetrix)	Réponse immune cytotoxique. Signalisation cellulaire. Cellules B. Cytokines. Macrophage. Expression de CSF1R par les cellules de HRS. Score associant expression de CSF1R en HIS et CD68 en IHC	Réponse au traitement de 1 <sup>ère</sup> ligne	166 patients IHC, ARNm HIS	PFS
<b>Scott DW (93)</b>	2013 J Clin Oncol	290, stades avancés	non	NanoString 259 gènes	Score moléculaire basé sur 23 gènes : <i>LMO2</i> , <i>RAPGEF2</i> , <i>TNFSF10</i> , <i>GLUL</i> , <i>CD68</i> , <i>ALDH1A1</i> , <i>STAT1</i> , <i>LYZ</i> , <i>CD68</i> , <i>RNF144B</i> , <i>CCL17</i> , <i>CD300A</i> , <i>WDR83</i> , <i>IL15RA</i> , <i>B2M</i> , <i>HLA-A</i> , <i>HLA-C</i> , <i>CXCL11</i> , <i>IRF1</i> , <i>PRF1</i> , <i>APOL6</i> , <i>COL6A1</i> , <i>PDGFRA</i> .	Réponse au traitement de première ligne	78 patients	FFS, OS

LH : lymphome de Hodgkin, IHC : immunohistochimie, HIS : hybridation in situ, TMA : tissue microarray, EFS : event-free survival (survie sans évènements), OS : overall survival, PFS : progression free survival, DSS : disease-specific survival

## 2. TEP-FDG et biomarqueurs

*Agostinelli et al* (95) ont étudié le rôle pronostic de certains biomarqueurs combinés à la TEP-FDG intermédiaire. Six *tissue microarrays* ont été construits en utilisant des anticorps ciblant certaines protéines : molécules régulatrices du cycle cellulaire (TOP2A, RRM2, MAD2L1, CDC2 et PCNA), molécules spécifiques de lignée B (BCL11a et CD20), molécules impliquées dans la réparation des dommages cellulaires et dans l'apoptose (p53 et BCL2), marqueurs macrophagiques (CD68, CD163, ALDH1A1 et STAT1), marqueurs T de cytotoxicité (TIA1, perforin et granzyme B ) et enfin molécules impliquées dans la régulation de l'immunité T (FOXP3, PD1 et SAP). 208 patients atteints LHe (stades localisés et avancés) traités par ABVD ont été inclus, avec une cohorte de validation de 102 patients. Une évaluation par TEP-FDG après deux cures de chimiothérapies a été réalisée (TEP-FDG2). En analyse multivariée, la TEP-FDG après deux cures était la seule variable prédictive de survie globale et de survie sans progression. Par contre chez les patients TEP-FDG2 négative, l'expression de CD68 et de PD1 dans le microenvironnement et le statut STAT1 négatif dans les cellules de HRS a permis d'identifier une population de patients TEP-FDG2 négative avec une survie sans progression à 3 ans significativement plus faible.

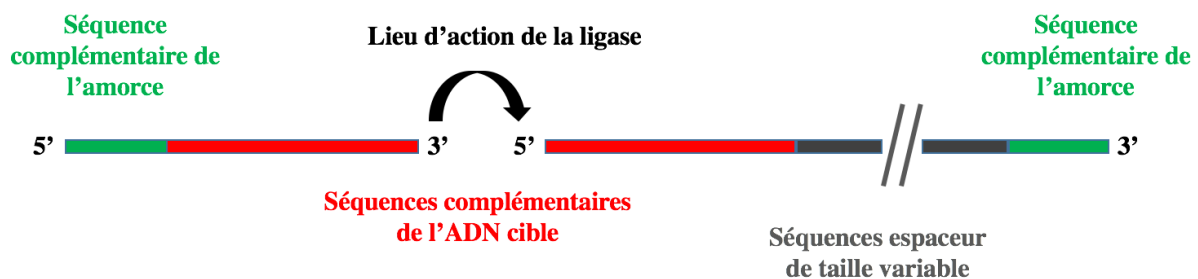
## VII. Principe de la RT-MLPA couplée au séquençage nouvelle génération (NGS)

### 1. Principe de la MLPA

La MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) est une technique de PCR multiplexe dépendante d'une étape de ligation dont la principale application est la détection de perte ou d'amplification de régions chromosomiques. Elle repose sur l'amplification simultanée de plusieurs dizaines de séquences nucléotidiques avec un seul couple d'amorces. Cette méthode, mise au point par *Schouten et al* en 2002 (96), est disponible soit sous forme de kit commerciaux adaptés à différentes pathologies, comme ceux commercialisés par MRC Holland, soit sous forme de kits "à façon", qui peuvent être développés dans les laboratoires de recherche. Elle est rapide, simple, peu coûteuse et ne nécessite pas de plateforme dédiée.

L'originalité de la MLPA réside dans le fait que les produits amplifiés lors de la réaction de PCR sont les sondes et non l'ADN de l'échantillon. Après avoir défini les séquences cibles sur l'ADN génomique, une sonde est utilisée pour chaque région à tester. Chaque sonde est initialement composée de deux oligonucléotides de synthèse, qui possèdent chacun une queue additionnelle. Ces oligonucléotides s'hybrident sur deux sites immédiatement adjacents de la séquence ADN cible, et l'ajout d'une ligase thermostable permet ensuite leur assemblage en une sonde unique. Cette étape assure la spécificité de la réaction, et ne permet aucun mésappariement. Une réaction de PCR utilisant des amorces qui correspondent aux queues additionnelles permet ensuite l'amplification simultanée de toutes les sondes liguées. Les amplicons sont ensuite détectés par analyse de fragments sur un séquenceur capillaire à l'aide d'un marqueur fluorescent présent sur une des deux amorces de PCR.

Chaque produit d'amplification diffère par sa taille (entre 80 et 480 paires de bases (pb)), grâce à l'ajout de séquences "espaceur" de longueur variable autorisant ainsi l'identification des sondes (et donc des gènes), ( **Figure 6** ).



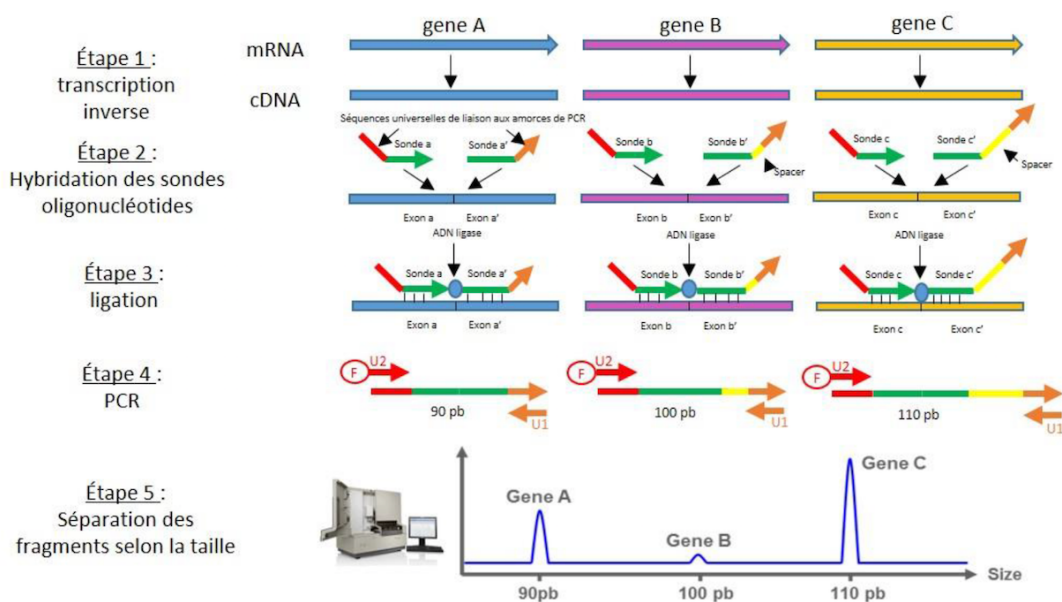
**Figure 6 : Représentation schématique de la MPLA**

Ces séquences *Stuffer* sont insérées entre les séquences spécifiques et les queues universelles afin d'obtenir une bonne résolution des pics : pour cela, un écart d'au moins 3 bases entre les amplicons est nécessaire.

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 sur des fragments d'ADN partiellement dégradés, rendant l'utilisation de cette technique possible à partir de prélèvements fixés inclus en paraffine (FFPE).

## 2. Profil d'expression génique par RT-MLPA

Les avantages de la MLPA ont conduit au développement de techniques dérivées pour l'étude de l'expression génique. La ligase ne pouvant pas agir sur des sondes hybridées sur de l'ARN, il est nécessaire de travailler sur l'ADN complémentaire (ADNc). Ainsi la RT-MLPA décrite par *Eldering et al (97)* en 2003 associe une étape de reverse-transcription (RT) au principe de la MLPA détaillé ci-dessus (**Figure 7**). Pour éviter l'éventuelle contamination par de l'ADN génomique, les séquences complémentaires des sondes chevauchent une jonction entre deux exons.



**Figure 7 : Profil d'expression génique par RT-MLPA**

D'après Philippe RUMINY (1) Transcription inverse de l'ARNm en ADNc. (2) Hybridation des deux demi sondes complémentaires de l'ADNc d'intérêt. (3) La ligase va permettre de suturer les deux demi sondes (à noter que la ligase ne permet pas de mésappariement). (4) Les différentes sondes sont amplifiées par PCR en utilisant des amorces universelles. Les séquences obtenues sont de taille différentes ce qui permet des les séparer et de les quantifier par analyse de fragments.

Initialement décrite par deux signatures d'expression génique (apoptose et inflammation), cette technique possède de nombreux avantages comparés aux techniques de micro-puces ou de PCR en temps réel. L'utilisation d'un seul couple d'amorces par cible autorise un niveau important de multiplexage, et ainsi une quantification relative par rapport à plusieurs gènes de référence. La partie la plus complexe du développement d'un essai réside dans le choix des sondes oligonucléotidiques. En effet, celle-ci est à l'initiative du laboratoire puisque très peu de kits de RT-MLPA sont actuellement disponibles dans le commerce.

Comme pour la MLPA, les séquences s'hybridant aux ADNc cibles sont courtes, entre 20 et 30 nucléotides en général. Elles peuvent donc s'hybrider à des fragments d'ADNc relativement courts et l'influence de la dégradation de l'ARN est ainsi limitée. Il est par conséquent possible d'utiliser cette technique sur des ARN extraits à partir de biopsies FFPE, le succès dépendant tout de même des conditions de conservation de ces tissus.

Des profils d'expression génique peuvent ainsi facilement être obtenus par RT-MLPA, après une étape de transcription inverse, les étapes suivantes restant les mêmes que celles de la MLPA. Une séquence issue de l'ADNc des transcrits étudiés sert de séquence cible. Ici, la hauteur de chaque pic reflète l'expression de chaque transcrit.

L'équipe de l'U918 a ainsi publié en 2015 une méthode permettant la classification des sous-types GCB / ABC par un test utilisant la technique RT-MLPA (98). Ce test 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.

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.

Toujours dans le but de poursuivre le développement de nouveaux tests d'analyse de signatures moléculaires, l'équipe U918 a récemment initié le développement d'une nouvelle méthode de RT-MLPA couplée à du séquençage nouvelle génération (NGS). Ici, la méthode de détection des produits RT-MLPA qui consiste en une électrophorèse capillaire a été remplacée par une étape de séquençage NGS. Ceci permet d'augmenter de façon très importante le nombre de marqueurs étudiés, actuellement limité à une vingtaine, tout en conservant la simplicité du protocole expérimental et en maîtrisant les coûts. Le but est de développer un outil diagnostique « pan lymphome » capable de différencier de nombreux sous types tumoraux. Ainsi un mix de 224 sondes ciblant 104 gènes a été

mis en place, ces gènes possèdent un intérêt diagnostic mais également pronostic et thérapeutique dans les lymphomes.

## **OBJECTIF**

Le lymphome de Hodgkin est une pathologie qui touche essentiellement les adultes jeunes. Le pronostic demeure excellent au prix d'un lourd traitement associant selon les cas chimiothérapie et radiothérapie.

Les complications à court moyen et long terme, dont certaines sont la conséquence des traitements, ont depuis longtemps conduit à rechercher les conditions d'une décroissance thérapeutique ou d'une adaptation thérapeutique en fonction des facteurs pronostics initiaux.

Les paramètres pronostics classiques ne permettent pas d'identifier les patients à risque de résistance au traitement de première ligne. Les facteurs pronostics biologiques tendent à se développer avec plusieurs études mettant en évidence leur pertinence.

Nos objectifs sont :

- Dans un premier temps, d'évaluer la faisabilité et la pertinence de la technique RT-MPLA "NGS" dans le lymphome de Hodgkin classique.
- Dans un second temps, d'établir un profil d'expression génique prédictif de survie globale et de survie sans progression dans une cohorte rétrospective de patients atteints de lymphome de Hodgkin classique tout stades confondus après traitement de première ligne. Le but étant d'identifier dès la prise en charge initiale les patients à risque de résistance au traitement afin d'adapter leurs prises en charge thérapeutique.

# MATERIELS ET METHODES

## I. Echantillons et Patients

Il s'agit d'une étude rétrospective monocentrique. Les patients âgés de plus 18 ans, atteints d'un lymphome de Hodgkin classique diagnostiqué entre 2009 et 2015 au centre Henri Becquerel de Rouen pouvaient être inclus. Ont été inclus les patients pour lesquels du matériel ARN extrait de tissu cryopréservé ou conservé en paraffine (FFPE) était disponible et dont nous disposions des données cliniques de stadification de la maladie et des données d'imagerie, notamment par TEP-FDG. Ont été exclus de l'étude les patients VIH positifs. Nous avons sélectionné en priorité les patients pour lesquels des données d'immunohistochimie (IHC) étaient disponibles.

Afin d'obtenir une cohorte homogène avec deux groupes de patients : **groupe en rémission complète (RC)** après traitement de première ligne et **groupe résistant** au traitement de première ligne (**rechute/réfractaire RR**), nous avons sélectionné 40 patients, 21 dans le groupe **RC** et 19 dans le groupe **RR**.

Selon les recommandations du LYSA, un patient est défini **réfractaire primaire** si la maladie progresse sous traitement ou dans les trois mois suivant la fin du traitement, ou s'il persiste une masse résiduelle au TEP-FDG (score 4 ou 5 sur l'échelle de Deauville) (**Annexe 5**). La **rechute** est définie par un échec du traitement de première ligne, survenant plus de 3 mois après la fin du traitement (> 3 mois) et dans les 12 premiers mois qui suivent la fin du traitement de première ligne (< 12 mois) (77).

Tous les patients avaient été diagnostiqués porteurs d'un LHc selon la classification OMS 2008 révisée en 2016 (2), après relecture des lames de biopsies tumorales par deux anatomopathologistes expérimentés en hématologie, et les sous types de LHc précisés selon les critères histologiques.

Parmi les 40 patients inclus, 28 patients ont été précédemment inclus dans une étude biologique prospective monocentrique (étude « Cytokines », N°RCB 2009-A01117-50) visant à analyser la cinétique d'évolution de différentes cytokines plasmatiques au cours du traitement du LHc, et 8 patients étaient inclus dans l'étude AHL 2011 du LYSA. Il s'agit d'une étude de non infériorité comparant la poursuite du traitement par quatre cycles d'ABVD pour les patients ayant une TEP-FDG négative après deux cycles de BEACOPPesc, à six cycles de BEACOPPesc.

Tous les patients avaient donné leur consentement éclairé pour la collection des échantillons histologiques, des données cliniques ainsi que l'analyse de biomarqueurs.



## II. Evaluation de la réponse au traitement

La réponse au traitement a été déterminée en suivant les critères de l'IWG rapportés par *Cheson* (99). Les résultats TEP ont été rapportés à l'aide de l'échelle visuelle de Deauville 5 points (**Annexe 5**) et suivant les critères de réponse modifiés IHP 2007 (**Annexe 6**). Le seuil pour définir la positivité de la TEP a été un score de Deauville supérieur ou égal à 4. La Réponse Complète (RC) en fin de traitement a été définie comme la négativité du TEP avec ou sans masse résiduelle. Une maladie réfractaire (RD) a été définie comme une maladie stable (SD), en réponse partielle (PR) ou progressive (PD), caractérisée par la persistance de toute masse positive en TEP ou l'apparition de nouvelles lésions positives en TEP.

## III. RT-MLPA couplée au séquençage NGS

### 1. Principe général

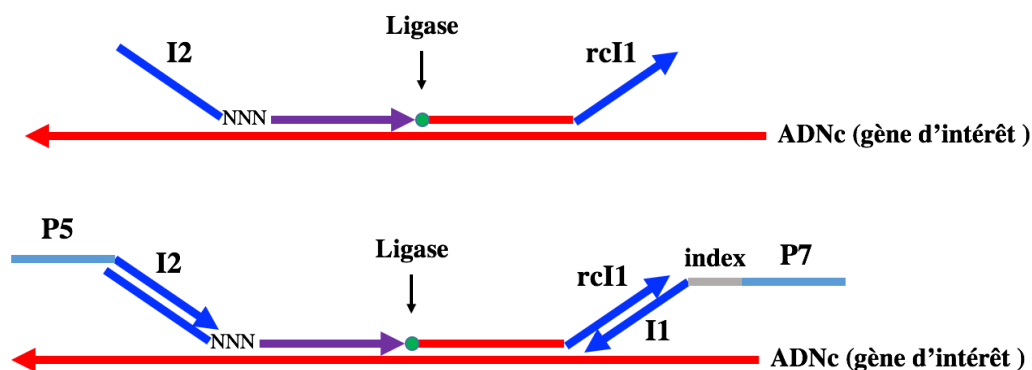
Comme pour la RT-MLPA classique, des couples de sondes oligonucléotidiques de synthèse complémentaires de l'ADNc du gène d'intérêt sont utilisés (**Figure 8**) :

- Un premier oligonucléotide contenant en 5' une queue additionnelle I2 identique à l'extrémité 3' de l'amorce qui sera utilisée pour l'étape PCR. La séquence I2 est suivie « d'identificateurs moléculaires uniques » UMI, qui sont des séquences aléatoires de 7pb permettant de quantifier les transcrits d'ARNm avec plus de précision. Enfin en 3' se trouve la séquence complémentaire de l'ADNc du gène d'intérêt.

- Un second oligonucléotide contenant en 5' la séquence complémentaire de l'ADNc du gène d'intérêt, et en 3' une queue additionnelle rcI1 (reverse complément Illu1), complémentaire de la seconde amorce utilisée à l'étape de PCR. Tous ces oligonucléotides 3' sont phosphorylés à leurs extrémités 5' afin de permettre les réactions de ligation.

Si l'ADNc du gène d'intérêt est présent dans l'échantillon, deux sondes présentes dans le mix oligonucléotidiques s'hybrident au niveau de la jonction « e » de l'ADNc. Après ligation, le couple de sondes est alors amplifié par PCR grâce aux amorces P5-Illu2 et P7-index-Illu1, contenant elles-mêmes des queues additionnelles P5 et P7 qui permettent l'analyse des produits sur un séquenceur.

Afin d'optimiser l'analyse des résultats, la technique de RT-MPLA est couplée au séquençage haut débit nouvelle génération (NGS) en utilisant la technologie Illumina qui permet d'analyser plusieurs dizaines d'échantillons de patients en une seule fois, sur une même Flow Cell.



**Figure 8 : Représentation schématique de la RT-MLPA couplée au séquençage NGS**

Synthèse d'un couple de sondes oligonucléotidiques : la 1<sup>ère</sup> contient en 5' la séquence additionnelle I2 suivie de la séquence UMI (identificateurs moléculaires uniques), et en 3' la séquence complémentaire de l'ADNc du gène d'intérêt. La 2<sup>ème</sup> contient en 5' la séquence complémentaire de l'ADNc du gène d'intérêt et en 3' la séquence rcI1 complémentaire de l'amorce utilisée pour la PCR. Hybridation des deux sondes au niveau de la jonction « e » de l'ADNc. Amplification par PCR grâce aux amorces P5-Illu2 et P7-index-Illu1.

Le logiciel Illumina Experiment manager est utilisé pour préparer la liste d'injection. Les résultats sont par la suite analysés en utilisant le logiciel MiSeq Run Analysis développé spécifiquement au sein de l'U1245.

Nom	Séquences nucléotidiques
<b>Illu2 (I2)</b>	5'-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3'
<b>rcIllu1(rcI1)</b>	5'-TCCAACCCTTAGGGAACCC-3'
<b>Illu1(I1)</b>	5'-GGGGTTCCTAAGGGTTGGA-3'
<b>P5I2</b>	5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3'
<b>P7I2</b>	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGGTTCCTAAGGGTTGGA-3'

**Tableau 3 : Séquences nucléotidiques universelles utilisées pour la RT-MLPA « NGS »**

## 2. Etape de RT-MLPA

Les extractions d'ARN ont été effectuées à l'aide de l'automate Maxwell® 16 de Promega. L'ARN extrait a été quantifié au Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific Carlsbad) et conservé à -80°. Pour l'étape de reverse transcription de l'ARN en ADNc, des réactifs de RT ont été préparés suivant le mélange suivant : 1.25µL de Tampon 5X de Transcriptase Inverse (TI), 0.5µL de DDT (dithithreitol) à 100mM, 1µL de dNTPs à 10mM et 1µL d'amorces hexamériques à 100pmoles/µl. Par la suite 3.75µL du réactif de RT ont été mélangés avec 2µL d'ARN (environ 500ng). Le produit obtenu a été incubé 2 minutes à 80° afin de désorganiser la structure secondaire de l'ARN, puis 5 min à 37°, permettant l'hybridation des amorces hexamériques. Après un refroidissement à 4°, 0.5µL de l'enzyme MMLV-RT (100u) ont été ajoutés dans chaque tube. La synthèse de l'ADNc a été effectuée pendant 15 minutes

d'incubation à 37°, suivie d'une étape de destruction de l'enzyme par chauffage à 98° pendant 2 minutes. Enfin les produits obtenus sont conservés à 4°.

Pour l'étape d'hybridation, 6.25µL d'ADNc sont transférés dans un nouveau tube et mélangés à 1.5µL de tampon MLPA (Salsa MLPA buffer) et 1.5µL du mélange de sondes. Les échantillons sont chauffés 2 minutes à 95° pour dénaturer l'ADNc puis 1 heure à 60° pour permettre l'hybridation des sondes MLPA à leurs cibles sur l'ADNc. La ligation intervient après ajout de 32µl de réactifs de ligation à 54°, directement dans le thermocycleur (25µL d'eau dépourvue de RNase, 3µL de Tampon A, 1µl de SALSA-Ligase 65, 3µL Tampon B de SALSA-Ligase 65). L'incubation dure ensuite 15 minutes et se termine par une étape d'inactivation de 5 minutes à 98°.

La PCR finale nécessite 5µL de produit de ligation, auxquels sont ajoutés 12.5µL de PCR Master Mix Hi Fidelity (Thermo Scientific), 5.5µL d'eau dépourvue de RNase, 2µL d'amorces P5I2 et P7BCI1 à 10µM. L'amplification se fait dans un thermocycleur avec le programme de PCR suivant : 6min à 94° puis 35 cycles de 30 sec à 94°, 30 sec à 58°, 30 sec à 72° puis enfin 4 min à 72°. Le produit de PCR est conservé à 4°. Les produits PCR sont par la suite purifiés à l'aide du kit Agencourt AMPure® XP et stockés à 4°.

### 3. Séquençage Illumina

- Dilution, dénaturation et mélange des librairies : Tous les échantillons sont dosés puis dilués avec le tampon EBT pour obtenir des librairies à 4nM. L'ensemble est *poolé* volume à volume, puis dénaturé avec une solution extemporanée de 5µl de NaOH 0.2N pour 5µl de librairie à 4nM. La dénaturation est arrêtée après 5min par l'ajout de 990 µl de HT1 froid. 240µl de cette librairie à 20pM sont ensuite ajoutés à 360µL de HT1 froid afin d'obtenir une librairie à 8pM. Les 600µl de librairie sont chargés dans la cartouche, ainsi que les *primers* de séquences préalablement préparés (mélange de 597µl de *primers* illumina + 3 µl de *primer* custom (SeqPrimer) à 100µM).
- Chargement, préparation de la *Flow Cell* et lancement du *run* : La *Flow Cell* est rincée avec de l'eau MilliQ, séchée puis nettoyée ; la cartouche est insérée dans le séquenceur, et la *sample sheet* chargée sur le séquenceur *Miseq* (ILLUMINA®).

Contrairement au séquenceur classique, qui renvoie des intensités de fluorescence proportionnelles aux niveaux d'expression des gènes, le séquenceur analyse plusieurs dizaines de milliers de courtes séquences individuelles pour chaque patient, chacune correspondant à une molécule d'ARN différente détectée dans l'échantillon de départ. L'analyse de ces séquences à l'aide d'outils bio-informatiques dédiés et leur comptage permet d'évaluer directement le niveau d'expression de chacun des marqueurs.

#### 4. Adaptation de la technique RT-MLPA au LHC

Un panel de 137 gènes a été mis en place au sein du laboratoire, ces gènes possèdent un intérêt diagnostique ou pronostic, le but étant de développer un outil permettant :

- Le diagnostic précis des différents sous-types de lymphomes non Hodgkiniens (lymphome B diffus à grandes cellules GC/ABC, lymphome primitif du médiastin, lymphome B à petites cellules, lymphome T périphériques)
- L'évaluation pronostic en mettant en évidence certains marqueurs pronostics tels que l'expression de *MYC* ou de *BCL2*.
- L'identification de certaines cibles thérapeutiques telles que l'expression de *CD30*, *CD20* et la mutation *BRAFV600E*.
- L'étude des marqueurs du microenvironnement tumoral et de la réponse immunitaire anti-tumorale.

Dans ce travail nous avons testé le panel de 137 gènes dans le lymphome de Hodgkin classique. Nous avons classé ces gènes en différents groupes de « signature moléculaire » pertinents dans le LHC (Tableau 4).

<b>Voies de signalisation</b>	JAK-STAT	<i>STAT6, JAK2, PIM2 (serine-thréonine kinase), ASB13 (SOCS)</i>
	NF-κB	<i>TRAF1, CD30 (TNFRSF8), MYD88, CD40 (TNFRSF5), APRIL, TACI, CARD11, BCMA (TNFRSF17), LIMD1, JAK2, CCDC50, PIM2, CD27</i>
	PI3K/AKT	<i>ITPKB, MAML3, TCL1A, S1PR2, FGFR1</i>
	JNK/MAP	<i>TRAF1, BCMA (TNFRSF17), DUSP22, CD27</i>
	BCR	<i>CARD11, SH3BP5, BANK1</i>
	BTK	<i>SH3BP5</i>
	TCR	<i>ZAP70</i>
	NOTCH	<i>MAML3</i>
	Cytokines	<i>APRIL, BAFF( ligand pour BCMA, TACI et BAFF-R)</i>
	Récepteurs de surface	<i>CD40 (TNFRSF5), TACI (TNFRSF13B), BCMA (TNFRSF17)</i>
<b>Microenvironnement</b>	Macrophages	<i>CD163, PRDM1, IL411 (polarisation M2), CD68, INFG, PD1</i>
	Lymphocytes « T »	<i>CD3, CD4, CD5, CD8, CD40L, CD23, LMO2, MAL, TRAC, CD56, CD28, CCR7, CCR4, CD200, CTLA 4, PD1, ZAP70 ICOS (Th2)</i>
	Cellules « B »	<i>IRF4/MUM1, CD19, CD22, APRIL, FOXP1, CD23, TACI, BAFF, MS4A1(CD20), SH3BP5, BANK, AID, CXCR5, CD80, CCR7, CD38, CD27, CD5, CD200 (CD45RO), PD1, CD10, MYBL1, IGHD, IGHM, IGH, IGL</i>
	Cellules myéloïdes	<i>BAFF, APRIL, PRDM1 (leucocytes), XBP1 (éosinophiles), CD38, CD200, PD1, PDL1</i>
	Plasmocytes	<i>CD138, XBP1, CD38</i>
	Cellules dendritiques	<i>CD56, CD80, CCR7, CD200</i>
	Matrice Extracellulaire	<i>CD56</i>
<b>Cycle cellulaire</b>	<i>CCND2, CCND1, NEK6</i>	

<b>Apoptose</b>	<i>CD95, BCL6, BCL2, TRAF1, CD30 (TNFRSF8), APRIL, PIM2</i>	
<b>Prolifération cellulaire</b>	<i>CCND2, CCND1, APRIL, ANXA1, S1PR2, Ki67</i>	
<b>EBV</b>	<i>EBER</i>	
<b>Métabolisme cellulaire</b>	Ubiquitination	<i>CRBN</i>
	Réticulum endoplasmique	<i>CREB3L2 (BBF2H7), XBP1, RAB7L1</i>
	Métabolisme énergétique	<i>IDH2 (mitochondrie), CYB5R2</i>
	Recyclage protéiques	<i>RAB7L1</i>
	Métabolisme du fer	<i>CD71</i>
<b>Réponse immunitaire</b>	Cytotoxique	<i>GrB, PRF, INFG</i>
	T Helper (Th)	<i>ICOS(Th2), GATA3 (Th2), T-BET (Th1), INFG, CCR4 (Th2)</i>
	T régulateurs (Treg)	<i>FOXP3</i>
	Natural killer (NK)	<i>CD56, CD38, PD1, INFG</i>
	Activation/régulation cellule T	<i>CD70, LAG3, IL411</i>
	Cellule présentatrice de l'antigène	<i>CD86, CD23, CD80, CCR7, PD1, PDL1</i>
	CMH II	<i>XBP1</i>
	CMH I	<i>B2M</i>
Immune check-point	<i>PDL1, PDL2, PD1, CTLA4</i>	
<b>Chimiokines</b>	<i>CXCL13 (lymphocytes TFH, chimiotactisme des lymphocytes B, récepteur : CXCR5),</i>	
<b>Cytokines</b>	<i>CD70 (TNFSF7, CD27L), TRAF1, APRIL, BAFF (TNFSF13B), INFG</i>	
<b>Facteurs de transcription</b>	<i>MEF2B(active la transcription du proto oncogène BCL6 dans le GC normal), CREB3L2, MYBL1</i>	
<b>Cellule HRS</b>	<i>CD40 (TNFRSF5), TRAF1, TAC1, BCMA(TNFRSF17), MAL, BAF, APRIL, STAT6, PIM2, PDL 1, IRF4/MUM1</i>	
<b>Proto-oncogènes / oncogènes</b>	<i>MYC, BCL6, BCL2, ALK (récepteur tyrosine kinase), RAB7L1</i>	
<b>Classification des LBDGC (GC/ABC)</b>	<i>LMO2, IRF4/MUM1, MYBL1, LIMD1, SH3BP5, FOXP1, S1PR2, CREB3L2, XBP1, RAB7L1, CYB5R2</i>	
<b>Diagnostics différentiels des lymphomes</b>	<i>ANXA1 (leucémie à tricholeucocytes), SERPINEA9 (GCET1), CD5, CD10, CD23</i>	
<b>Pronostique</b>	<i>MYC, BCL6, BCL2, MEF2B</i>	

**Tableau 4 : Liste des gènes RT-MLPA adaptée au LHc**

## IV. Immunohistochimie

Nous disposons de données d'IHC pour 24 patients, 15 patients en RC et 9 patients en RR. Les principales informations concernant la technique sont détaillées dans le (**Tableau 5**). La lecture des résultats a été effectuée par deux anatomo-pathologistes.

Les anticorps PD-L1, EBER et XPO1 marquent les cellules tumorales. Les anticorps PD1, CD4, CD8, CD68 et CD163 marquent les cellules du microenvironnement tumoral.

Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) de cellules marquées par rapport à la cellularité globale, sauf pour PD-L1 et XPO1 où les résultats sont exprimés en % de cellules marquées par rapport au nombre total de cellules tumorales .

	Fournisseur	Référence	Clone	Dilution	pH	Linker	Kit Détection	Automate
<b>PDL1</b>	Ozyme	13684S	E1L3N	1/200	9	non	Envision Flex	Autostaine r 48
<b>CD4</b>	Clinisciences	Mob119	1F6	1/30	9	non	Envision Flex	OMNIS
<b>CD8</b>	DAKO	M7103	C8/144 B	1/50	9	non	Envision Flex	OMNIS
<b>CD20</b>	DAKO	M0755	L26	1/2000	6	oui	Envision Flex	OMNIS
<b>CD68</b>	DAKO	M0876	PG111	1/500	9	non	Envision Flex	OMNIS
<b>CD163</b>	Novocastra	NCL-1-CD163	10P6	1/25	9	non	Envision Flex	Autostaine r 48
<b>XPO1</b>	Santa Cruz	sc-5595		1/300 Over night 4°C	6	non	Vestastain Elite	Manuel
<b>EBER</b>	Ventana	800-2842					ISH View Blue	Benchmar K-XT

**Tableau 5 : Caractéristiques des anticorps utilisés en immunohistochimie.**

## V. Analyse statistique

La survie globale (OS) a été calculée depuis la date de diagnostic jusqu'à la date des dernières nouvelles ou la date de décès, toutes causes confondues. La survie sans progression (PFS) a été calculée depuis la date de diagnostic jusqu'à la date de progression de la maladie, de la rechute, du traitement de rattrapage ou de décès, toutes causes confondues. Les courbes de survie ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier. Afin d'évaluer la survie en fonction de l'expression génique des patients, une sélection de gènes d'intérêts a d'abord été réalisée. Les expressions étant des mesures quantitatives, le test de Student ou le test non paramétrique de Wilcoxon (suivant le caractère gaussien des données) ont été appliqués pour mettre en évidence une différence statistique d'expression entre les patients en réponse complète et les patients en rechute ou réfractaires. Etant donné le nombre important d'expressions géniques mesurées, une correction de Bonferroni a été appliquée aux gènes pour lesquels le résultat des tests était significatif. Deux gènes ont ainsi été sélectionnés : *BCMA* et *MYC*. Les survies globales et sans progression ont ensuite été évaluées en fonction des expressions de ces deux gènes par un modèle de Cox. Une courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) a été réalisée, permettant de définir la meilleure valeur seuil permettant de distinguer les patients en réponse des patients en rechute ou réfractaires. Précisément, cette valeur seuil est définie comme étant celle maximisant le produit de la sensibilité et de la spécificité. Les différences de survie suivant l'expression génique de ces deux gènes ont été évaluées par le test du log-rank. La concordance des mesures d'expression, effectuées par la technique de séquençage d'une part et l'immunohistochimie d'autre part, a été mesurée par le coefficient de corrélation intra-classe lorsque les deux variables étaient quantitatives, et par le coefficient de Kappa lorsque les mesures d'IHC étaient qualitatives, les mesures par séquençage étant dans ce cas transformées en variables qualitatives par classes. Un algorithme de classification à visée exploratoire a été proposé, afin de classer les patients en RC ou en RR en fonction de l'expression de *MYC* et *BCMA*. Il s'agit d'un système d'apprentissage de règles nommé JRip (du package R Weka) correspondant à la méthode de RIPPER (*Repeated Incremental Pruning to Produce Error Reduction*) de William W. Cohen (1995).

# RÉSULTATS

## I. Caractéristiques cliniques et démographiques

Les principales caractéristiques cliniques et démographiques des patients inclus sont résumées dans (**Tableau 6**). L'âge médian au diagnostic était de 32 ans et 57,7% des patients étaient des hommes. Il n'y avait pas de différence entre les deux groupes en termes d'âge au diagnostic, de statut ECOG, de présence ou non de symptômes « B », et de sous-types histologiques. Il y avait une majorité d'hommes dans le groupe RR. Concernant le stade de la maladie au diagnostic, il y avait plus de stades avancés (stade III/IV) dans le groupe RR. Aucun des patients de stades avancés dans le groupe RR ne présentait de score IPS élevé (entre 3 et 7), en effet tous les patients avaient un score bas (entre 0 et 2), alors que dans le groupe RC, 7 patients avaient un score IPS bas et 3 patients un score IPS élevé.

Le traitement de première ligne était conforme aux standards de traitement dans le LHc. Les stades localisés ont été traités par trois à quatre cures d'ABVD suivies d'une radiothérapie, les stades avancés ont été traités par huit cures d'ABVD. Les patients inclus dans le protocole AHL 2011 ont reçu, en fonction de la randomisation initiale et du statut de la TEP-FDG intermédiaire réalisée à 2 cures, soit six cures de BEACOPPesc, soit deux cures de BEACOPPesc, suivies d'une désescalade à quatre cures d'ABVD. Il existait une différence entre les deux groupes. Dix-sept patients ont été traités par trois à quatre cures d'ABVD suivies d'une radiothérapie (12 dans le groupe RC et 5 dans le groupe RR), 15 patients ont reçu huit cures d'ABVD, enfin sur les 8 patients inclus dans le protocole AHL 2011, 3 patients ont bénéficié de six cures de BEACOPPesc (1 dans le groupe RC et 2 dans le groupe RR), et 5 patients ont bénéficié de deux cures de BEACOPPesc suivies d'une désescalade à quatre cures d'ABVD (4 dans le groupe RC et 1 dans le groupe R/R).

Parmi les patients du groupe en RR, 15 patients ont bénéficié d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétique, et 5 patients ont été allogreffés.



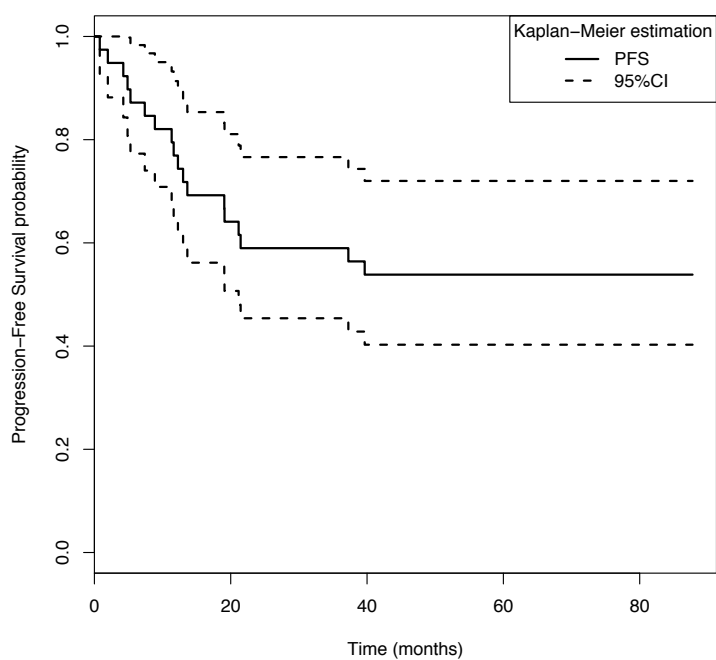
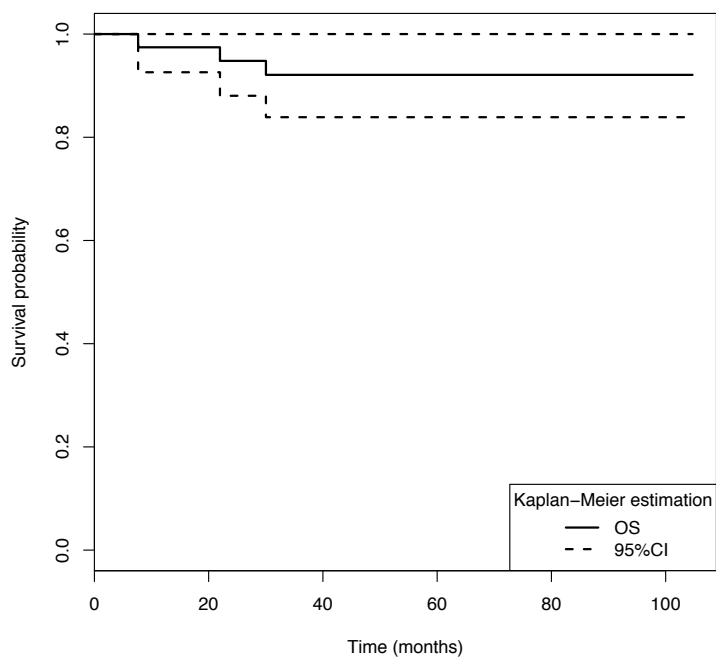
CARACTERISTIQUES	POPULATION TOTALE N = 40 (%)	PATIENS RC N = 21 (%)	PATIENS R/R N = 19 (%)	P
<b>SEXE</b>				0.049
<b>HOMMES</b>	23 (57.5)	9 (42.9%)	14 (73.7)	
<b>FEMMES</b>	17 (42.5)	12 (57.1%)	5 (26.3)	
<b>AGE</b>				0.19
<b>AGE MEDIAN</b>	32	32	32.5	
<b>VALEURS EXTREMES</b>	18-83	18-57	21-83	0.19
<b>ECOG</b>				0.75
<b>0-1</b>	40 (100)	21 (100)	19 (100)	
<b>2-4</b>	0	0	0	
<b>STADE ANN ARBOR</b>				0.00011
<b>STADE I</b>	1 (2.5)	0	1 (5.3)	
<b>STADE II</b>	12 (30)	12 (57.1)	0	
<b>STADE III</b>	13 (32.5)	3 (14.3)	10 (52.6)	
<b>STADE IV</b>	14 (35)	6 (28.6)	8 (42.1)	
<b>SYMPTOMES B</b>				0.24
<b>PRESENTS</b>	23 (59)	10 (50)	13 (68.4)	
<b>ABSENTS</b>	16 (41)	10 (50)	6 (31.6)	
<b>FACTEURS DE RISQUE</b>				
<b>LYSA/EORTIC (STADE II-II)</b>				1
<b>FAVORABLES</b>	12 (70.6)	8 (66.7)	4 (80)	
<b>DEFAVORABLES</b>	5 (29.4)	4 (33.3)	1 (20)	
<b>IPS (STADE III-IV)</b>				0.42
<b>0-2</b>	14 (58.3)	7 (70)	7 (50)	
<b>3-7</b>	10 (41.7)	3 (30)	7 (50)	
<b>SOUS TYPE HISTOLOGIQUE</b>				
<b>SCLERONODULAIRE</b>	32 (82.1)	18 (85.7)	14 (77.8)	0.68
<b>CELLUARITE MIXTE</b>	5 (12.5)	1 (4.8)	4 (21.1)	0.17

DEPLETION LYMPHOCYTAIRE	0	0	0	0.75
RICHE EN LYMPHOCYTES	2 (5)	1 (4.8)	1 (5.3)	1
NOS	1 (2.5)	1 (4.8)	0	1
TRAITEMENT PREMIERE LIGNE				0.036
3 A 4 ABVD + RT	17 (42.5)	12 (57.1)	5 (26.3)	
8 ABVD	15 (37.5)	4 (19)	11 (57.9)	
6 BEACOPP	3 (7.5)	1 (4.8)	2 (10.5)	
2 BEACOPP + 4 ABVD	5 (12.5)	4 (19)	1 (5.3)	
TEP INTERMEDIAIRE	40 (100)			
TEP C2 POSITIVES	10 (40)	4 (23.5)	6 (75)	0.028
TEP C2 NEGATIVES	15 (60)	13 (76.5)	2 (25)	
TEP C4 POSITIVES	7 (19.4)	0	7 (46.7)	0.00077
TEP C4 NEGATIVES	29 (80.6)	21 (100)	8 (53.3)	
TEP C6 POSITIVES	3 (30)	0	3 (50)	0.2
TEP C6 NEGATIVES	7 (70)	4 (100)	3 (50)	
TEP C8 POSITIVES	3 (37.5)	0	2 (40)	0.2
TEP C8 NEGATIVES	5 (62.5)	3 (100)	3 (60)	
DECES	4 (10.5)	0	4 (21.1)	0.032

**Tableau 6 : Caractéristiques cliniques et démographiques des patients inclus**

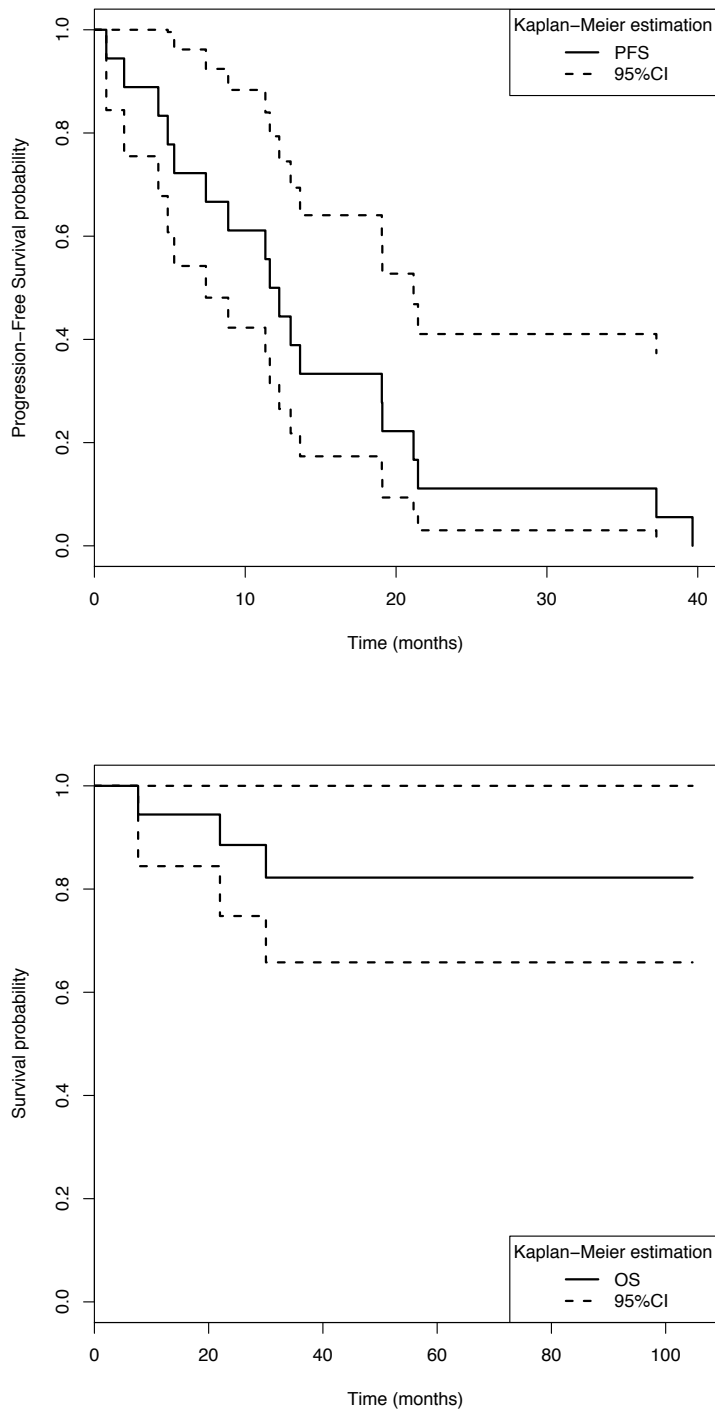
## II. Survie globale (OS) et survie sans progression (PFS)

Avec un suivi médian de 65.38 mois, le taux de survie globale de la cohorte à 2 ans était de 94,8% [Intervalle de Confiance à 94.8% IC 95% : 88%-100%], et de 92.1% à 3 ans et 5 ans [IC 95% : 83.9%-100%]. Le taux de survie sans progression à 1 an était de 76.9% [IC 95% : 64.8%-91.4% ], à 2 ans et 3 ans de 59% [IC 95% : 45.4%-76.6% ] et à 5 ans de 53.8% [IC 95% : 40.3%-72%] (**Figure 9**).



**Figure 9 : Survie globale (OS) et survie sans progression (PFS) de la cohorte**

Le taux de survie globale dans le groupe RR à 2 ans était de 88.5% [IC 95% : 74.8%-100%], et de 82.2% à 3 et 5 ans [IC 95% : 65.8%-100%]. Le taux survie sans progression dans le groupe RR était de 50% à 1 an [IC 95% : 31.5%-79.4%], 11.1% à 2 ans et 3 ans [IC 95% : 3%-41%] et de 0% à 5 ans [IC 95% : 3%-41%] (**Figure 10**).



**Figure 10 : Survie globale (OS) et survie sans progression (PFS) du groupe RR**

### III. Analyse de l'expression génique globale

Au total 38 ARN ont été analysés, 19 dans le groupe RR, et 19 dans le groupe RC. Au final sur les 19 ARN analysés dans le groupe RC, 15 données d'expression génique ont pu être générées, en effet pour 4 ARN, la technique fut un échec, probablement dû à la mauvaise qualité de l'ARN. Sur les 19 patients en RR, nous avons rencontré un seul échec. Donc au total, nous disposons de 33 données d'expression génique. Les données d'expression génique moyennes de tous les gènes sont présentées dans le **Tableau 7**, et sous forme de *Heatmap* dans la **Figure 11**.

Parmi les 137 gènes présents dans le panel « lymphome », des données d'expression génique ont été générées pour 113 gènes, et 15 gènes présentaient une différence d'expression génique statistiquement significative entre les deux groupes RC et RR. Il s'agit de *BCL6*, *BCMA*, *CCDC50*, *CD40*, *CD86*, *CD95*, *CRBN*, *ICOS*, *KI67*, *MEF2B*, *MYBL1*, *MYC*, *MYD88*, *Imu.alpha* et *XPO1*.

Gènes	RC		RR		P*
	Expression moyenne	Médiane	Expression moyenne	Médiane	
AIDe2.AIDe3	0	[0 - 1.65]	0.76	[0 - 156.19]	0.068
AIDe4.AIDe5	0.2	[0 - 2.33]	0.89	[0 - 117.63]	0.12
ALK	0	[0 - 1.02]	0	[0 - 15.04]	0.21
ANXA1	86.54	[0 - 249.14]	127.09	[18.17 - 4192.54]	0.06
APRIL	23.32	[5.77 - 155.24]	29.43	[8.24 - 185.1]	0.083
ASB13	9.83	[0.84 - 46.44]	9.97	[2.47 - 67.4]	0.72
B2M	673.19	[0 - 1186.14]	538.19	[0 - 1647.29]	0.83
BAFF	78.8	[5.77 - 304.89]	82.9	[17.41 - 172.41]	0.91
BANK	22.03	[1.92 - 186.24]	75.22	[0 - 386.94]	0.21
BCL2e1.BCL2e2	17.46	[0 - 27.68]	16.75	[0.39 - 38.41]	0.92
BCL2e1b.BCL2e2b	9.72	[0 - 28.85]	8.76	[0 - 35.56]	0.8
BCL6e1.BCL6e2	32.84	[0 - 65.2]	48.67	[27.27 - 144.61]	<b>0.01</b>
BCL6e3.BCL6e4	23.94	[0 - 73.76]	32.2	[0 - 148.76]	0.39
BCMA	1.32	[0 - 5.94]	3.8	[0 - 154.41]	<b>0.0025</b>
BRAFV600E	0	[0 - 3.14]	0	[0 - 0.12]	0.4
CARD11	4.4	[0 - 34.73]	7.8	[1.16 - 71.69]	0.31
CCDC50	25.8	[0 - 137.1]	63.34	[0.39 - 831.49]	<b>0.017</b>
CCND1	108.12	[0 - 208.16]	90.17	[28.44 - 343.05]	0.83
CCND2	163.35	[54.99 - 381.17]	203.62	[73.59 - 717.81]	0.33
CCR4	76.61	[0 - 488.79]	67.09	[1.16 - 502.37]	0.61
CCR7	62.83	[0 - 265.28]	58.87	[0 - 241.22]	0.68

CD10	2.2	[0 - 192.32]	4	[0 - 219.59]	0.37
CD138	5.39	[0 - 22.47]	4.36	[0 - 183.88]	0.84
CD163	32.37	[0 - 217.45]	13.39	[0.38 - 220.6]	0.94
CD19	9.92	[0 - 203.12]	27.37	[0 - 397.22]	0.053
CD22	70.19	[0 - 291.97]	109.15	[0.78 - 238.91]	0.52
CD23	15.04	[0 - 161.58]	23.34	[0 - 532.9]	0.76
CD27	45.76	[7.7 - 173.54]	33.95	[4.63 - 167.4]	0.49
CD28	33.87	[0 - 108.95]	33.18	[0 - 305.24]	0.86
CD3	271.94	[4.09 - 413.43]	168.12	[20.82 - 474.03]	0.16
CD30	13.67	[2.59 - 98.06]	19.73	[1.59 - 338.15]	0.54
CD38	18.39	[0 - 73.38]	26.73	[0.39 - 85.37]	0.63
CD4	408.68	[17.32 - 1053.47]	324.62	[50.96 - 835.73]	0.5
CD40	21.97	[0 - 95.68]	41.54	[20.29 - 256.81]	<b>0.023</b>
CD40Le2.CD40Le3	11.14	[0 - 37.01]	18	[0.61 - 122.08]	0.26
CD45RO	101.62	[0 - 194.22]	93.52	[0 - 219.43]	0.76
CD5	13.25	[2.19 - 49.03]	11.99	[0 - 41.9]	0.47
CD56	0.98	[0 - 5.94]	1.84	[0 - 6.94]	0.21
CD68	101.69	[19.25 - 387.26]	81.07	[7.4 - 955.58]	0.54
CD70	5.98	[0 - 56.61]	11.99	[0.39 - 127.31]	0.37
CD71	12.13	[0 - 38.43]	20.04	[0 - 53.22]	0.12
CD8	108.68	[14.75 - 751.79]	71.77	[12.45 - 233.18]	0.076
CD80	23.76	[1.92 - 86.6]	32.58	[16.4 - 135.96]	0.25
CD86	23.74	[0 - 85.25]	39.44	[0 - 117.39]	<b>0.018</b>
CD95	32.83	[0 - 142.36]	60.32	[27.57 - 184.53]	<b>0.0067</b>
CRBN	24.26	[0 - 45.58]	50.48	[0.39 - 245.16]	<b>0.019</b>
CREB3L2	163.48	[3.85 - 319.08]	75.38	[26.04 - 373.67]	0.13
CTLA4	69.84	[3.85 - 287.33]	65.24	[2.31 - 241.14]	0.94
CXCL13	25.11	[0 - 358.53]	81.31	[0 - 1431.83]	0.13
CXCR5	41.55	[3.85 - 120.22]	33.43	[0 - 90.84]	0.38
CYB5R2	2.97	[0 - 41.75]	2.43	[0 - 15.18]	0.97
DUSP22	37.55	[0 - 71.44]	28.58	[0 - 62.74]	0.95
EBER1	2.33	[0 - 2151.79]	0.84	[0 - 168.9]	0.73
FGFR1	57.25	[20.36 - 122.57]	43.38	[7.51 - 462.43]	0.19
FOXP1	32.11	[0 - 198.53]	54.74	[0 - 217.91]	0.25
FOXP3	33.97	[0 - 122.42]	21.3	[0 - 90.78]	0.41
GATA3	51.36	[11.55 - 281.17]	57.48	[8.42 - 182.89]	0.52
GRB	36.49	[0 - 275.91]	35.9	[0 - 228.82]	0.93
Ialpha.Calpha	0.57	[0 - 11.92]	2.32	[0 - 55.7]	0.08
ICOS	6.2	[0 - 47.72]	19.94	[0 - 120.94]	<b>0.015</b>

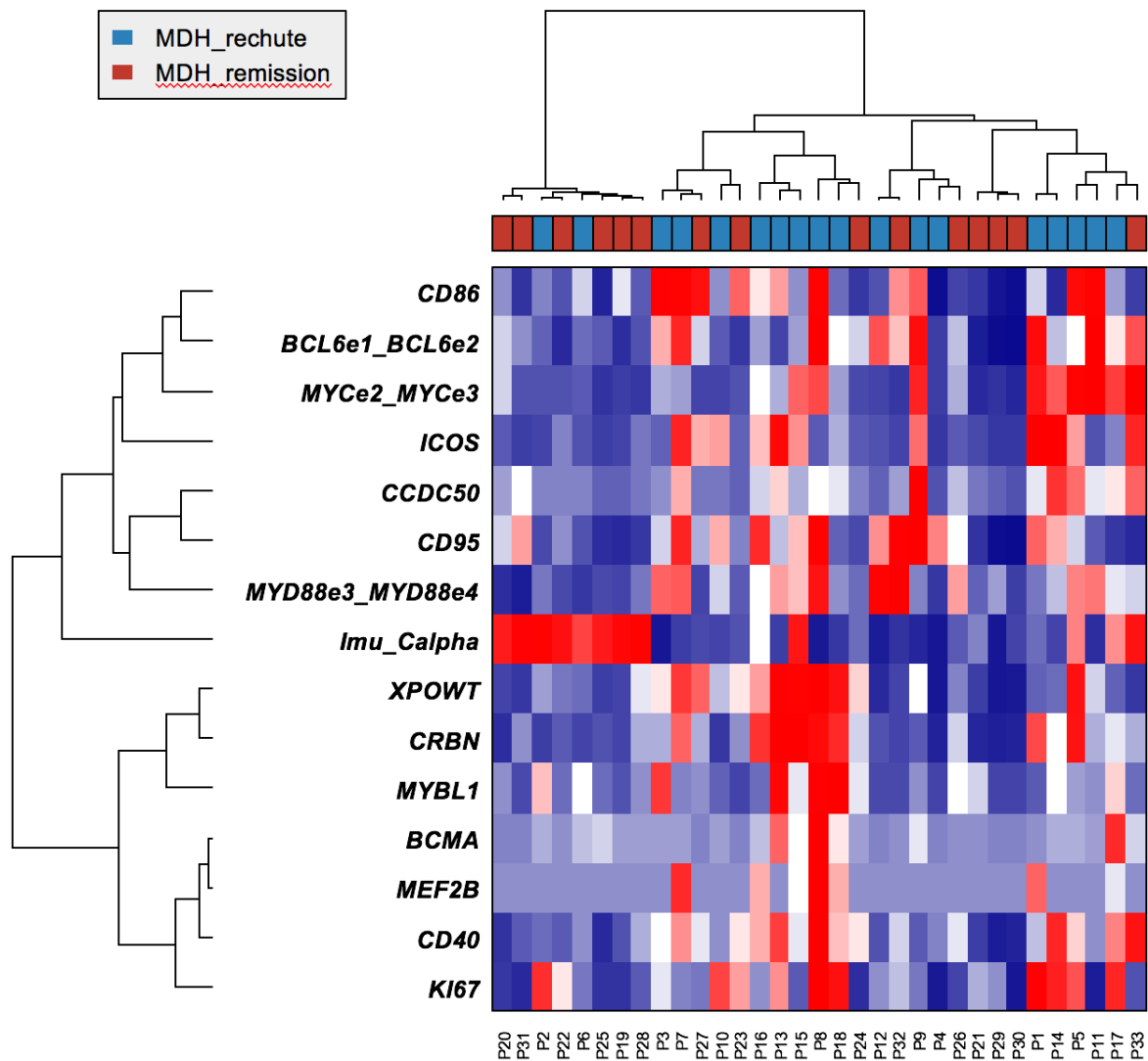
Iepsilon.Cepsilon	5.83	[0 - 85.67]	2.33	[0 - 273.32]	0.18
Igamma.Calpha	0	[0 - 1.45]	0.03	[0 - 12.28]	0.86
Igamma.Cgamma	8.37	[0 - 45.9]	9.58	[0 - 79.1]	0.8
Igamma.Cmu	0	[0 - 0]	0	[0 - 0.22]	0.1
IGHD	149.85	[17.85 - 483.16]	120.48	[5.06 - 561.09]	0.28
IGHM	175.31	[8.17 - 520.93]	128.89	[0 - 581.7]	0.77
IL4I1	59.04	[10.36 - 146.97]	37.67	[5.67 - 341.02]	0.54
Imu.Calpha	3.07	[0 - 12.55]	1.8	[0 - 11.48]	<b>0.036</b>
Imu.Cgamma	1.02	[0 - 8.16]	0.79	[0 - 9.64]	0.33
Imu.Cmu	169.56	[28.87 - 521.97]	93.81	[1.16 - 778.8]	0.18
INFG	15.56	[0 - 135.07]	22.74	[0 - 133.27]	0.26
IRF4	9.49	[0 - 14.92]	8.68	[2.08 - 23.16]	0.71
ITPKB	8.95	[0 - 70.85]	22.22	[1.17 - 82.39]	0.12
JAK2	80.96	[0 - 145.91]	77.65	[15.44 - 458.57]	0.52
JH.Calpha	310.88	[54.26 - 1650.38]	183.52	[0 - 2139.66]	0.29
JH.Cepsilon	5.28	[0 - 104.68]	1.89	[0 - 46.13]	0.073
JH.Cgamma	1000.11	[151.52 - 8110.08]	559.03	[23.37 - 2552.09]	0.31
JH.Cmu	411.95	[65.85 - 884.37]	310.64	[5.78 - 1291.08]	0.97
KI67	7.06	[0 - 17.08]	15.45	[0.39 - 62.54]	<b>0.0067</b>
LAG3	5.46	[0 - 22.54]	2.94	[0 - 21.2]	0.19
LIMD1	21.78	[0 - 45.52]	27.35	[0 - 52.42]	0.43
LMO2	6.42	[0 - 23.36]	7.77	[0 - 126.01]	0.18
MAL	25.56	[4.09 - 69.94]	16.37	[0 - 1001.29]	0.23
MAML3	12.93	[0 - 25.58]	5.31	[0 - 29.81]	0.46
MEF2B	0	[0 - 0]	0	[0 - 1.66]	<b>0.0079</b>
MS4A1	14.15	[0 - 208.01]	54.48	[0 - 873.84]	0.06
MYBL1	3.18	[0 - 8.65]	6.41	[0 - 71.52]	<b>0.026</b>
MYCe1.MYCe2	255.96	[26.94 - 1462.6]	209.5	[106.17 - 930.12]	0.41
MYCe2.MYCe3	34.91	[0 - 524.76]	103.74	[24.93 - 527.53]	<b>0.0027</b>
MYD88e3.MYD88e4	14.35	[1.35 - 141.85]	26.42	[8.57 - 73.28]	<b>0.0083</b>
NEK6	40.63	[0 - 78.13]	33.53	[0.39 - 149.79]	1
PD1	7.32	[0 - 27.8]	7.93	[0 - 47.54]	0.91
PDL1	7.25	[0 - 33.39]	9.38	[0 - 36.43]	0.56
PDL2	83.87	[0 - 543.63]	43.73	[6.47 - 403.76]	0.29
PIM2	137.67	[7.7 - 251.19]	68.79	[7.79 - 356.02]	0.12
PRDM1	18.5	[1.92 - 39.38]	25.57	[10.52 - 69.93]	0.089
PRF	7.95	[0 - 28.1]	4.91	[0 - 36.43]	0.39
RAB7L1	17.87	[0 - 38.91]	20.84	[0.39 - 50.96]	0.53
S1PR2	10.01	[0 - 26.77]	5.17	[0.61 - 33.11]	0.06

SERPINA9	0	[0 - 4.71]	0.19	[0 - 36.21]	0.21
SH3BP5	80.3	[25.02 - 260.99]	136.49	[0 - 644.38]	0.12
STAT6	44.09	[22.67 - 255.36]	59.43	[13.07 - 207.72]	0.64
TACI	3.05	[0 - 16.04]	2.11	[0 - 10.08]	0.97
TBET	52.2	[0 - 181.93]	34.93	[0 - 215.7]	0.1
TCL1A	11.07	[0 - 264.26]	35.56	[0 - 219.05]	0.19
TCRbeta	185.92	[15.4 - 507.58]	188.35	[18.51 - 752.45]	0.89
TCRdelta	4.69	[0 - 14.64]	4.51	[0 - 37.11]	0.56
TCRgamma	5.98	[0 - 32.18]	7.88	[0 - 28.07]	0.55
TRAC	93.52	[1.92 - 253.7]	73.03	[0 - 313.02]	0.25
TRAF1	121.22	[38.78 - 330.95]	103.26	[17.15 - 974.72]	0.8
XBP1	72.49	[0 - 191.19]	85.4	[0.39 - 328]	0.33
XPOWT	55.25	[0 - 176.88]	122.72	[0.78 - 521.76]	<b>0.017</b>
ZAP70	180.06	[12 - 2255.36]	225.45	[12.73 - 5685.85]	0.83

**Tableau 7 : Expressions géniques moyennes des gènes analysées par RT-MLPA dans la cohorte (n = 33) (classement des gènes par ordre alphabétique)**

\* la valeur de p est donnée sans correction pour les tests multiples.





**Figure 11 : Expressions géniques moyennes des gènes analysés par RT-MLPA dans la cohorte (n = 33) représentées sous forme de heatmap.**

#### **IV. Corrélation entre les données d'immunohistochimie et de transcriptome**

Dans le but d'évaluer la pertinence et la faisabilité du test RT-MLPA « NGS », nous avons pu comparer les données d'expression en RT-MLPA de 8 gènes (*PD1*, *PD-L1*, *CD68*, *CD163*, *CD4*, *CD8*, *EBER* et *XPO1*) à celles obtenues au niveau protéique par IHC. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 8**.

Il existe une très bonne corrélation pour PD1, CD163 et une bonne corrélation pour EBER. En revanche nous n'observons pas de corrélation pour CD4, CD8, CD68, PD-L1 et XPO1.

Gènes	Coefficient de corrélation intra classe (ICC)	[IC 95% ]	p-value	Conclusion
<b>CD4</b>	-0.48	-0.742 < ICC < -0.086	0.99	Mauvaise corrélation intra classe
<b>CD8</b>	-0.162	-0.534 < ICC < 0.267	0.77	Mauvaise corrélation intra classe
<b>CD68</b>	-0.32	-0.637 < ICC < 0.116	0.93	Mauvaise corrélation intra classe
<b>CD163</b>	0.434	0.032 < ICC < 0.717	<b>0.02</b>	<b>Très bonne corrélation intra classe</b>
<b>PD1</b>	0.574	0.208 < ICC < 0.801	<b>0.002</b>	<b>Très bonne corrélation intra classe</b>
<b>PD-L1</b>	-0.907	-0.96 < ICC < -0.79	1	Mauvaise corrélation intra-classe
	<b>Coefficient de Kappa</b>			
<b>EBER</b>	0.75	0.41- 1.08	<b>0.005</b>	<b>Bonne corrélation</b>
<b>XPO1WT</b>	-0.3	-0.513 -0.082	0.98	Pas de corrélation

**Tableau 8 : Corrélation entre IHC et données d'expression génique**

## **V. Donnée d'expression génique des gènes significatifs**

### **1. Sélection des gènes**

Le test RT-MLPA couplé au séquençage NGS a généré un nombre important de données d'expression génique. Compte tenu des multiples tests réalisés dans cette cohorte de faible effectif, une correction de Bonferroni a été appliquée aux gènes pour lesquels le résultat des tests était significatif, à savoir : *BCL6*, *BCMA*, *CCDC50*, *CD40*, *CD86*, *CD95*, *CRBN*, *ICOS*, *KI67*, *MEF2B*, *MYBL1*, *MYC*, *MYD88*, *XPO1* et *Imu.Calpa*. Après application de cette correction, les expressions des gènes *BCMA* et *MYC* sont statistiquement distinctes (**Tableau 9**).

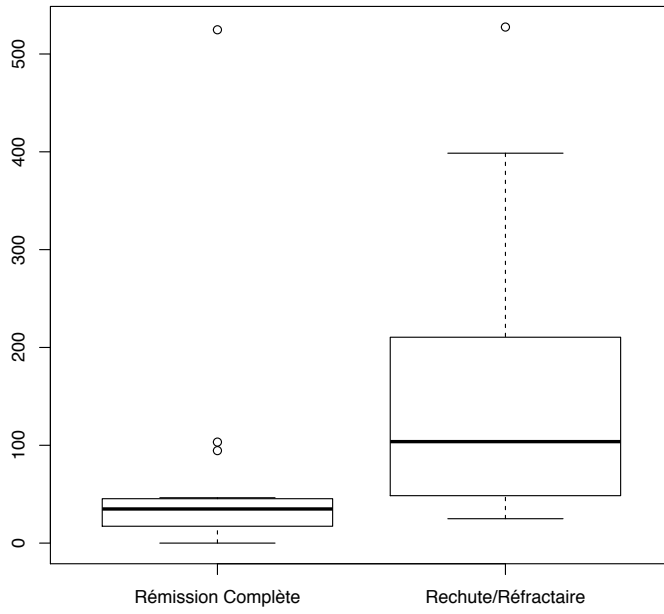
<b>GENES</b>	<b>P</b>
<i>BCL6E1.BCL6E2</i>	0.0900
<i>BCMA</i>	<b>0.0375</b>
<i>CCDC50</i>	0.1200
<i>CD40</i>	0.1200
<i>CD86</i>	0.1200
<i>CD95</i>	0.0871
<i>CRBN</i>	0.1200
<i>ICOS</i>	0.1200
<i>IMU.CALPHA</i>	0.1200
<i>KI67</i>	0.0871
<i>MEF2B</i>	0.0871
<i>MYBL1</i>	0.1200
<i>MYD88E3.MYD88E4</i>	0.0871
<i>MYCE2.MYCE3</i>	<b>0.0378</b>
<i>XPOWT</i>	0.1200

**Tableau 9 : Correction de Bonferroni appliquée aux gènes significatifs**

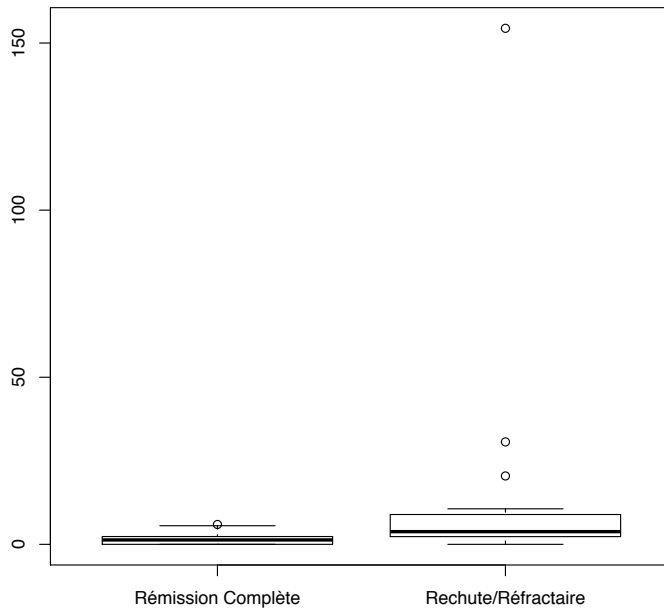
## **2. Expression différentielle des gènes *BCMA* et *MYC* entre les groupes RC et RR**

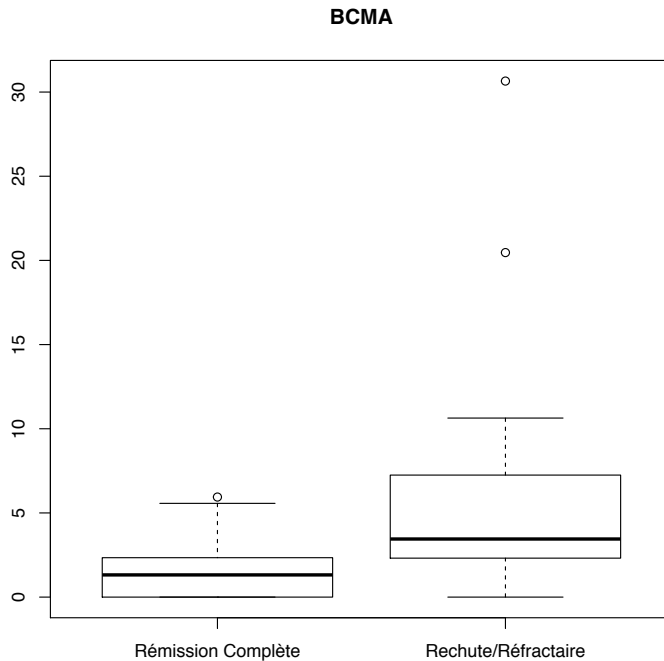
Les données moyennes d'expression génique des gènes *BCMA* et *MYC* en fonction de la réponse au traitement de première ligne sont présentées dans la **Figure 12**. Les gènes *BCMA* et *MYC* sont clairement surexprimés dans le groupe de patients en RR comparativement au groupe de patients en RC. A noter que pour un patient, l'expression génique moyenne de *BCMA* présente une donnée extrême de 154,41.

**MYCe2\_MYCe3**



**BCMA**





**Figure 12 : Expression génique moyenne des gènes *MYC* et *BCMA* en fonction de la réponse au traitement de première ligne**  
(*MYC*  $p = 0.0027$ , *BCMA*  $p = 0.002$ )

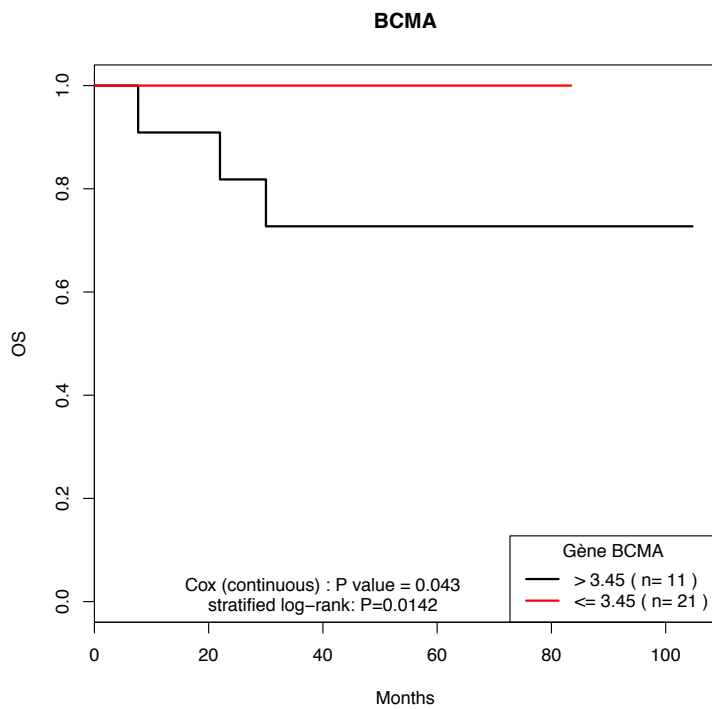
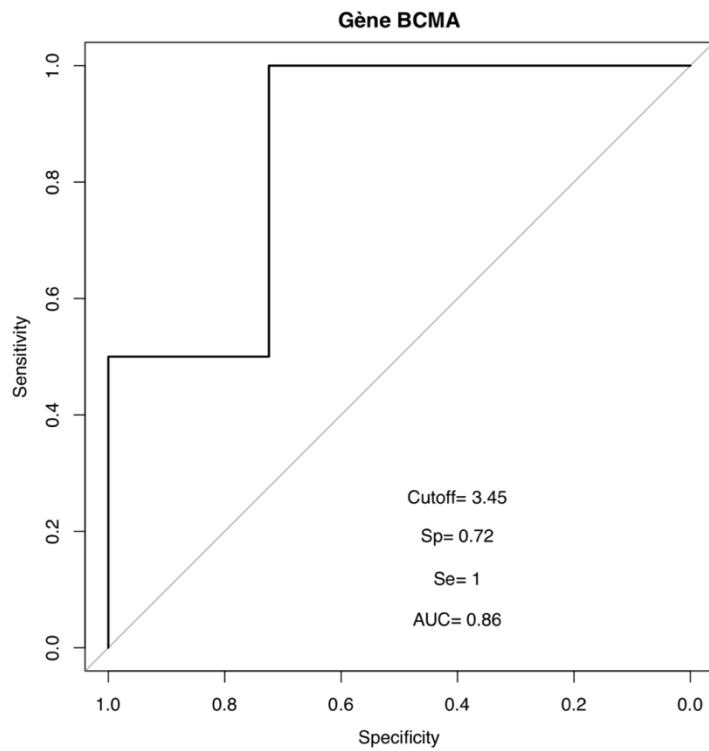
## VI. Courbes de survie en fonction de l'expression de *BCMA* et *MYC*

Les survies globales et sans progression ont été évaluées, en fonction de l'expression génique des gènes *MYC* et *BCMA* par un modèle de Cox. Une courbe ROC a permis de définir la meilleure valeur seuil permettant de distinguer les deux groupes RC et RR.

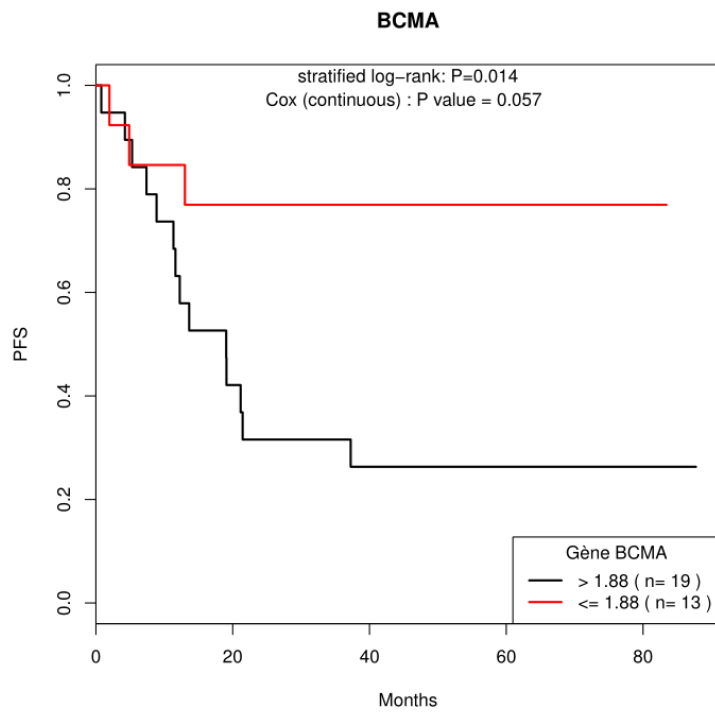
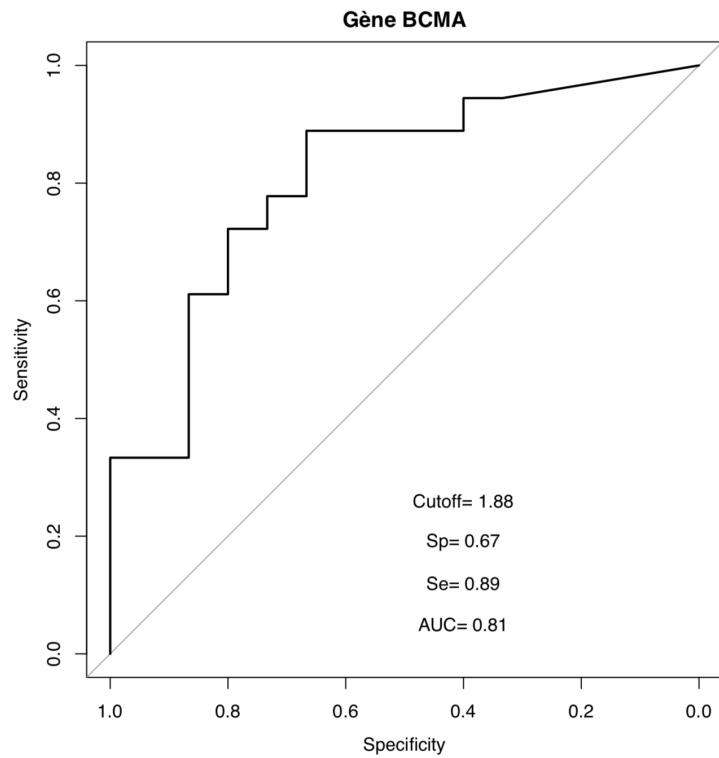
Les valeurs seuils correspondent aux données d'expression génique moyennes qui permettent de distinguer les patients en réponse des patients en rechute ou réfractaires avec la meilleure sensibilité et la meilleure spécificité possible (idéalement proche de 1).

### 1. Gène *BCMA*

Les valeurs seuils définies pour l'évaluation de la survie globale et de la survie sans progression sont respectivement de 3.45 et 1.88. Il existe une différence de survie globale et de survie sans progression en fonction de l'expression génique de *BCMA* ( $p = 0.0142$  et  $p = 0.014$ ) (**Figure 13**, **Figure 14**).



**Figure 13 : Courbe ROC et survie globale (OS) en fonction de l'expression génique de *BCMA***

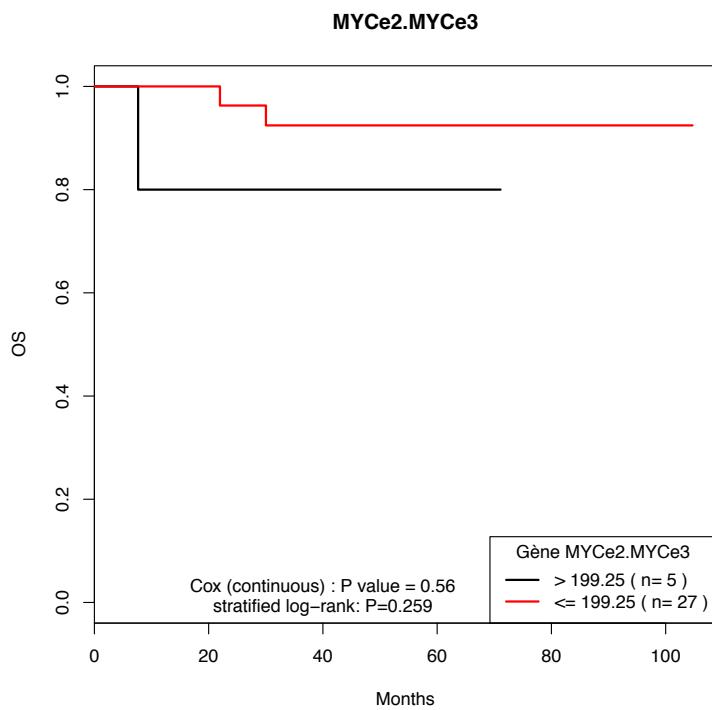
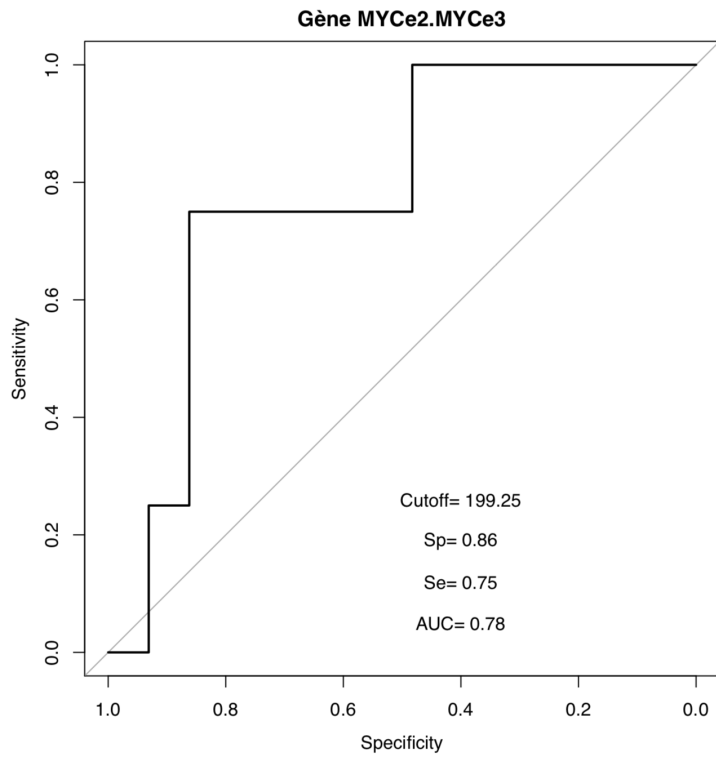


**Figure 14 : Courbe ROC et survie sans progression (PFS) en fonction de l'expression génique de *BCMA***

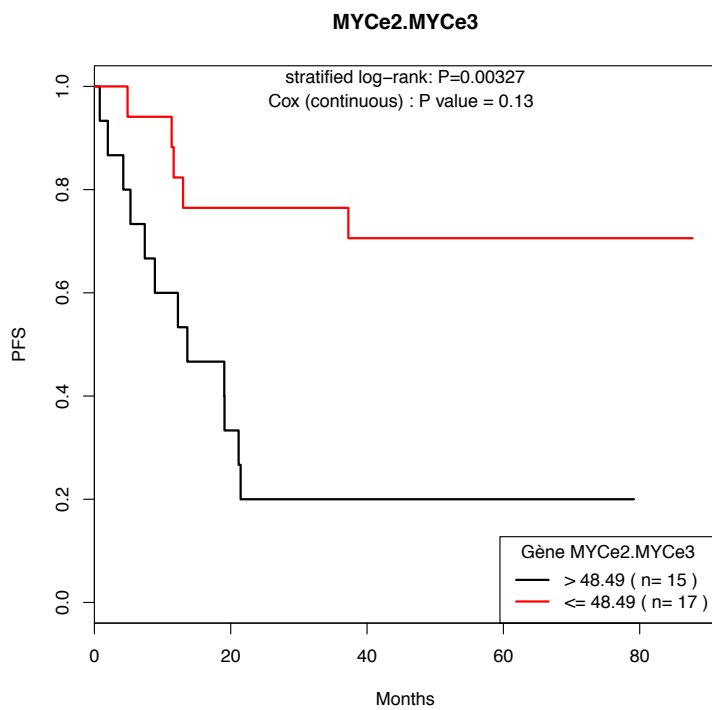
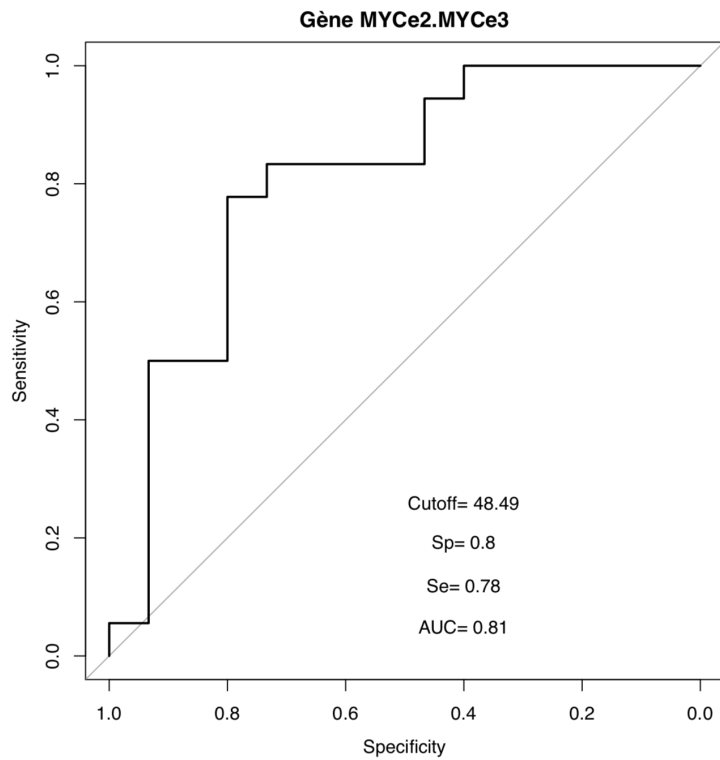
## 2. Gène *MYC*

Les valeurs seuils définies pour l'évaluation de la survie globale et de la survie sans progression sont respectivement de 199.25 et 48.49. Il n'existait pas de différence de survie globale en fonction de l'expression de *MYC* ( $p = 0.259$ ). En revanche, il existait une différence de survie sans progression en fonction de l'expression de *MYC* ( $p = 0.00327$ ) (**Figure 15**, **Figure 16**).





**Figure 15 : Courbe ROC et survie globale (OS) en fonction de l'expression génique de *MYC***



**Figure 16 : Courbe ROC et survie sans progression (PFS) en fonction de l'expression génique de *MYC***

## VII. Proposition d'un algorithme de classification

Nous avons mis en place un algorithme de classification (package RWeka, logiciel R, algorithme RIPPER, de Cohen) afin de classer les patients en RC ou en RR en fonction de leur expression de *MYC* et *BCMA*. Les patients dont l'expression moyenne de *MYC* est  $\leq 44.39$  sont classés dans le groupe RC, pour les patients restant, on regarde l'expression moyenne de *BCMA*, si elle est  $\leq 1.32$ , les patients sont classés dans le groupe RC, et le reste des patients est classé dans le groupe RR, (Figure 17).

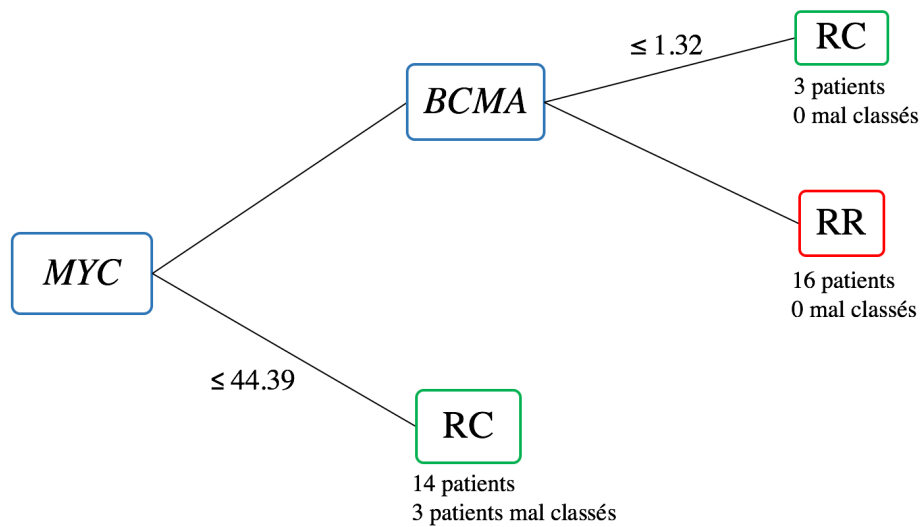


Figure 17 : Algorithme de classification

## DISCUSSION

### I. La technique RT-MLPA « NGS » est une approche innovante appliquée pour la première fois au lymphome de Hodgkin

Notre étude rapporte pour la première fois l'utilisation de la technique RT-MLPA couplée au séquençage « NGS » dans une cohorte d'échantillons de LHC non microdisséqués, en rémission complète ou en rechute et/ou réfractaires après traitement de première ligne.

Des données d'expression génique ont pu être générées grâce à cette technique avec un faible taux d'échec. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des différences d'expression génique entre les deux groupes de patients à savoir en rémission complète et en rechute et/ou réfractaires. Les quelques échecs rencontrés sont expliqués par la mauvaise qualité de l'ARN de départ.

Dans la littérature il existe peu d'études de « GEP » dans le lymphome de Hodgkin classique. Les principales études publiées (**Tableau 2**) ont utilisé soit des puces à ADNc avec au préalable une étape de transcription inverse de l'ARN en ADNc (87)(88)(89), soit de l'amplification par PCR quantitative (qPCR) (92). Plus récemment *Scott DW et al.* ont rapporté l'utilisation de la technologie Nanostring, une technique qui permet de s'affranchir de l'étape de transcription inverse et d'amplification par PCR (93).

La technique RT-MLPA mais non couplée au séquençage NGS a par ailleurs déjà été utilisée à des fins diagnostics. En effet l'équipe de l'U918 a publié en 2015 son utilisation pour la classification des sous-types GCB / ABC / PMBL (100). Par comparaison à cette première version de la RT-MLPA, l'ajout d'une étape de séquençage NGS nous a permis d'augmenter de façon très importante le nombre de marqueurs étudiés (une vingtaine versus plus d'une centaine), tout en conservant la simplicité du protocole expérimental et un coût raisonnable.

	RT-MLPA « classique »	RT-MPLA « NGS »
<b>Gène d'intérêt</b>	ADNc	ADNc
<b>Amplification des sondes par PCR</b>	Oui	Oui
<b>Nombre de marqueurs analysés simultanément</b>	~ 20	>100
<b>Lecture des résultats</b>	Analyse de fragments par électrophorèse capillaires	Séquençage NGS
<b>Coût des réactifs</b>	5 €	20€

**Tableau 10 : Tableau comparatif des deux techniques RT-MLPA.**

## II. Les données de RT-MLPA « NGS » corrèlent avec certaines données immunohistochimiques

Nous avons par la suite pu tester l'expression de certains gènes à l'échelle protéique. En comparant les données d'expression génique aux données d'IHC, nous avons pu déterminer une corrélation entre l'expression génique des gènes *PDI*, *CD163* et *EBER* et leur expression au niveau protéique.

Le CD68 et le CD163 sont utilisés en IHC comme marqueurs des cellules macrophagiques. Il existe une très bonne corrélation entre les données d'expression génique de *CD163* générées par RT-MLPA « NGS » et l'expression protéique analysée par IHC. En revanche, les données d'expression génique du *CD68*, un autre marqueur des cellules macrophagiques, ne corrèlent pas avec les données d'IHC. Cette différence pourrait être expliquée par des différences de spécificités cellulaires de ces deux marqueurs, de régulation post transcriptionnelle, ou encore d'une précision du comptage IHC des cellules positives.

CD163 est un récepteur *scavenger* impliqué d'une part dans la reconnaissance des particules opsonisées par l'IgG et d'autre part dans la clairance des complexes hémoglobine/haptoglobuline qui prévient l'inflammation. Il marque spécifiquement les monocytes et les macrophages et plus spécifiquement les macrophages à polarisation « M2 » (M2a : réparation et cicatrisation des tissus, M2b et M2c : action régulatrice et anti inflammatoire).

Le CD68 est une glycoprotéine utilisée comme marqueur des monocytes et des macrophages. Il est moins spécifique que le CD163. En plus des macrophages/monocytes, il marque les fibroblastes et les cellules inflammatoires du microenvironnement tumoral (cellules myéloïdes, cellules dendritiques, cellules de Langerhans...).

Il a été démontré qu'une signature moléculaire macrophagique était associée à un mauvais pronostic dans le LHc. L'équipe de *Steidl et al* (89) a identifié une signature *Tumor Associated Macrophage* dans le microenvironnement tumoral des LHc associée à un échec au traitement de première ligne. Les résultats de cette étude ont été validés par IHC pour le CD68 dans une cohorte indépendante. Un fort marquage macrophagique CD68+ dans le microenvironnement était associé à une survie sans progression plus courte et à une plus forte probabilité de rechuter après autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Dans cette étude le choix s'est porté sur le CD68 plutôt que le CD163.

Quelques équipes se sont intéressées à évaluer la capacité des deux marqueurs macrophagiques, CD68 et CD163, à différencier les *Tumor Associated Macrophage* dans le LHc. Une étude s'est plus particulièrement intéressée à l'évaluation de la reproductibilité inter-observateur des résultats d'immunohistochimie par CD68 et CD163 dans une cohorte rétrospective de 88 LHc. Cinq anatomopathologistes ont été évalués, l'index de corrélation intra-classe était plus élevé pour le

CD163, avec une différence en terme de survie globale uniquement pour le CD163. Chez les patients de stades avancés avec un score IPS élevé, la survie globale était plus mauvaise chez les patients avec un plus fort marquage CD163. Ainsi le CD163 apparaît comme un meilleur marqueur que le CD68 (101).

*PD1* est exprimé par les cellules du microenvironnement tumoral, notamment par les cellules T cytotoxiques, les cellules NK, les cellules B, les cellules présentatrices d'antigène, les monocytes et les macrophages. L'expression de *PD1* par les lymphocytes traduit une anergie immunitaire et participe ainsi au phénomène d'échappement tumoral. L'expression de *PD1* et *PD-L1* par les leucocytes du microenvironnement tumoral est associée à un mauvais pronostic dans le LHc (102). En IHC, PD1 est également un marqueur du microenvironnement tumoral, il n'est ainsi pas étonnant de constater une très bonne corrélation entre les données de transcriptome et d'expression protéique.

*PD-L1* et *PD-L2* (ligands de PD1) sont surexprimés dans les cellules de HRS suite à des translocations impliquant le locus 9p24.1 et par les cellules non malignes du microenvironnement tumoral (40). En IHC, PD-L1 marque majoritairement les cellules tumorales, ceci pourrait expliquer l'absence de corrélation entre les deux techniques.

A noter que dans de rares cas, on retrouve un double marquage des cellules tumorales et du microenvironnement par les anticorps PD1 et PD-L1.

*EBER*, correspondant à l'ARN viral non codant du virus EBV, est exprimé par les cellules de HRS ayant une infection latente à l'EBV. En IHC, il marque spécifiquement les cellules de HRS, d'où la concordance entre les résultats des deux techniques.

Les données d'expression génique générées reflètent la composition de la tumeur dans sa globalité, à savoir les cellules de HRS et le microenvironnement tumoral. L'IHC est une technique de marquage cellulaire limitée dans l'espace, elle permet d'évaluer l'infiltrat cellulaire à un endroit précis de la tumeur, qui varie en fonction du niveau de coupe. Le microenvironnement tumoral est constitué d'un infiltrat polymorphe inflammatoire hétérogène. Ainsi les limites de corrélation qu'on a pu observer peuvent être, en partie, expliquées par les difficultés de comparaison entre une technique qui analyse la tumeur dans son intégralité à une technique qui n'évalue qu'une partie de la tumeur. De même l'immunohistochimie reste une technique opératoire dépendante, difficilement reproductible avec une imprécision dans le dénombrement des cellules. De plus, il existe un marquage non spécifique des cellules du microenvironnement tumoral par CD68, CD4, CD8 et PD-L1 qui conduit à une difficulté d'interprétation.

### III. Un profil d'expression génique permet de différencier les patients en rechute et/ou réfractaires des patients en rémission complète prolongée.

Notre deuxième objectif était d'établir un profil d'expression génique prédictif de survie globale et de survie sans progression.

Nous avons pu identifier parmi une liste de 137 gènes, 15 gènes statistiquement significatifs : *BCL6*, *BCMA*, *CCDC50*, *CD40*, *CD86*, *CD95*, *CRBN*, *ICOS*, *KI67*, *MEF2B*, *MYBL1*, *MYC*, *MYD88* et *XPO1* et *Imu.Calpha*. Par la suite nous avons pu en sélectionner deux : *MYC* et *BCMA*.

Comme il a déjà été évoqué dans l'introduction, les résultats des différentes études de GEP dans le lymphome de Hodgkin différent à l'échelle moléculaire « individuelle », en effet les profils d'expression génique retrouvent des listes de gènes différentes d'une étude à une autre. En revanche si l'on classe ces gènes en groupes de « signature moléculaire » on retrouve plus de similitude. Ainsi dans notre étude nous avons pu identifier une liste de gènes que l'on peut regrouper en différentes signatures moléculaires (**Tableau 11**). Ainsi nos résultats se rapprochent des principales études de GEP en terme de signature moléculaire.

Signature moléculaire		Gènes
Voie de signalisation : NF-κB		<i>CD40</i> , <i>MYD88</i> , <i>CCDC50</i>
Réponse immune	Cellules B	<i>CD40</i>
	Cellule T	<i>CD40</i> , <i>CD86</i> , <i>ICOS</i>
Apoptose		<i>CD95</i>
Prolifération cellulaire		<i>KI67</i>
Métabolisme, trafic cellulaire		<i>CRBN</i> , <i>XPO1</i>

**Tableau 11 : Signatures moléculaires des 15 gènes sélectionnés**

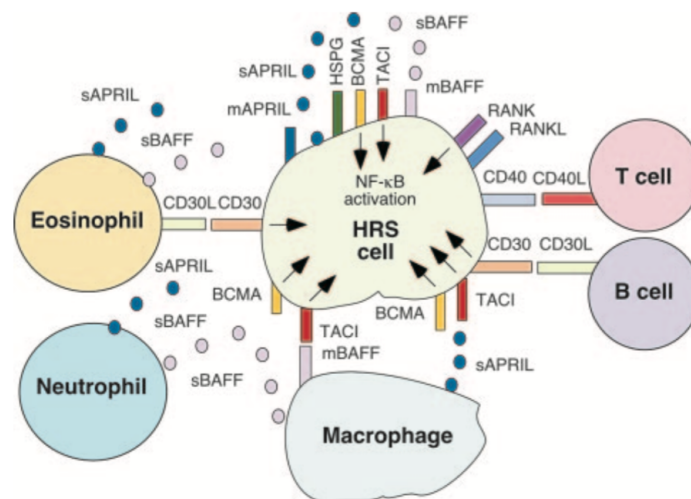
Dans le LHc, les interactions avec le microenvironnement tumoral sont essentielles à la survie des cellules de HRS. *BCMA* (*B-cell maturation antigen*) est un membre de la superfamille des récepteurs aux TNF (*tumor necrosis factor receptor superfamily member*), aussi appelé TNFRSF17. Les cellules myéloïdes du microenvironnement tumoral expriment *BAFF* (*B-cell Activating Factor*) et *APRIL* (*a proliferation-inducing ligand*), deux molécules essentielles à la différenciation, la prolifération et la

survie des cellules B et des plasmocytes. BAFF et APRIL activent les cellules B et les plasmocytes en se liant aux récepteurs TACI et BCMA, s'ensuit alors une activation de la voie NF- $\kappa$ B (14).

Dans le LH, les cellules de HRS expriment à leurs surfaces les récepteurs TACI et BCMA. La liaison de BAFF et APRIL aux récepteurs TACI et BCMA génère des signaux de survie et de prolifération cellulaire. En effet il existe une stimulation paracrine des récepteurs TACI et BCMA présents à la surface des cellules de HRS par BAFF et APRIL (**Figure 18**). L'interruption de la signalisation BAFF et APRIL (siRNA, TACI-Ig) altère la survie et la prolifération des cellules de HRS.

BAFF et APRIL stimulent également l'expression de *BCL-2*, *BCL-X* et *c-MYC* dans les cellules de HRS, ainsi on pourrait suggérer qu'il existe une corrélation entre la surexpression de *BCMA* et de *MYC*.

Par ailleurs, du point de vue thérapeutique, BAFF et APRIL atténuent l'action anti-tumorale de la Doxorubicine, molécule essentielle dans les schémas thérapeutiques prescrits dans le LH. La Doxorubicine est un agent intercalant de l'ADN bloquant la synthèse de l'ADN et de l'ARN, ainsi les lignées cellulaires de LH exposées à cette molécule meurent par apoptose. Ces effets sont partiellement ou totalement réversibles par l'action de BAFF et APRIL. BAFF et APRIL participent également au phénotype de résistance à la prednisone. Ainsi BAFF et APRIL participent à réduire la sensibilité des cellules de HRS à la chimiothérapie. BCMA étant l'un des récepteurs de BAFF et APRIL, on pourrait imaginer qu'il participe indirectement à ces phénomènes de résistance (14).



**Figure 18 : Interactions entre TACI, BCMA, APRIL et BAFF au sein de la cellule de HRS**

D'après April Chiu et al (14). Les cellules de HRS expriment TACI et BCMA. Les cellules myéloïdes du microenvironnement (macrophage, neutrophiles, éosinophiles) stimulent les récepteurs TACI et BCMA via la sécrétion de BAFF et APRIL, s'ensuit une activation de la voie NF- $\kappa$ B.



*MYC* est un proto-oncogène impliqué dans de nombreux cancers. C'est un facteur de transcription capable de moduler l'expression d'une multitude de gènes cibles (dans le sens activation ou répression). Le gène est localisé dans la région 8q24 et possède trois exons. La dérégulation de l'expression du gène *MYC* dans les cancers peut être due à différents mécanismes dont les principaux sont les amplifications, les translocations chromosomiques ou les insertions virales.

*MYC* possède un rôle ambivalent. Il peut être pro ou anti-apoptotique. Dans les lignées cellulaires de LHC (L1236, L428 et L540), il a plutôt un rôle anti-apoptotique. En effet le knockdown de *MYC* dans ces lignées cellulaires augmente l'apoptose des cellules de HRS (103). Dans d'autres cellules il a un rôle pro apoptotique notamment dans les fibroblastes (104). L'apoptose est dans ce cas médiée par la voie p53.

Une équipe a récemment démontré qu'il existait une régulation de l'expression de *MYC* par le micro ARN « miR-24-3p » dans le LH (105). miR-24-3p est surexprimé dans le LH et protège les cellules de HRS de l'apoptose. Une des cibles identifiées de miR-24-3p est le gène *MYC*. L'inhibition de miR-24-3p entraîne une augmentation du nombre de cellules en apoptose ainsi qu'une augmentation du taux protéique de *MYC* (évalué par Western-Blot). Ainsi il a été suggéré que le miR-24-3p diminuait l'expression de *MYC* et diminuait ainsi l'apoptose. Par ailleurs dans les lignées cellulaires de LH où *MYC* possède un rôle pro apoptotique, on ne retrouve pas de mutations de p53, ainsi *MYC* sensibiliserait les cellules à l'apoptose induite par CD95/Fas.

Dans notre travail, *MYC* est surexprimé dans le groupe RR. On pourrait suggérer que *MYC* possède plutôt un rôle anti-apoptotique médié par CD95/Fas et participerait ainsi au phénotype de résistance au traitement de première ligne. Toutefois *MYC* pourrait être régulé de manière post-transcriptionnelle et être dégradé par des micro ARN. Nos résultats obtenus au niveau du mRNA doivent être validés à l'échelle protéique par IHC.

Nous avons démontré qu'il existait une différence d'expression génique des gènes *MYC* et *BCMA* en fonction de la réponse au traitement de première ligne. A noter qu'un patient présentait une donnée extrême d'expression génique de *BCMA*. Il s'agit d'un patient du groupe RR qui présentait une pathologie particulièrement résistante à de multiples lignes de chimiothérapies, incluant une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

Il est intéressant de noter que *BCMA* fait l'objet d'un ciblage thérapeutique par la technologie des CAR-T cells dans le myélome multiple et que notre approche pourrait donc permettre d'identifier les patients en rechute et/ou réfractaires susceptibles de bénéficier de cette thérapie innovante (106).

#### **IV. Notre étude est limitée par un faible effectif et l'absence de cohorte de validation**

Notre étude présente plusieurs limites. Il s'agit d'une étude rétrospective à effectif réduit avec une sélection de deux groupes de patients : groupe RC et groupe RR. Nous avons choisi de sélectionner deux groupes homogènes de patients afin de pouvoir tester la faisabilité et la pertinence de la technique, en effet il s'agit d'une technique innovante jamais testée auparavant.

La cohorte est hétérogène en terme de stadification de la maladie, des schémas thérapeutiques et de statuts pronostics. Ceci ne diffère pas de la plupart des études de GEP qui ont pour la majorité inclus une cohorte hétérogène de patients notamment en terme de stadification de la maladie.

Enfin la technique, développée initialement dans le but de mettre au point un outil diagnostique et pronostic « pan lymphome » a été adaptée secondairement au lymphome de Hodgkin classique. Néanmoins la plupart des gènes testés possèdent un intérêt certains dans le lymphome de Hodgkin.

## CONCLUSION

Nous rapportons pour la première fois l'utilisation d'une technique originale et innovante, la RT-MLPA couplée au séquençage « NGS » appliquée à une cohorte de patients atteints de LHc.

Cette technique a permis de générer des données d'expression génique avec un faible taux d'échec à partir d'ARN extraits de tissus cryoconservés ou inclus en paraffine (FFPE).

Nous avons également pu mettre en évidence des différences d'expression génique entre les deux groupes de patients en RC et en RR avec identification de 15 gènes reflétant des signatures moléculaires pertinentes dans le LHc. L'expression de deux gènes, *MYC* et *BCMA*, par le tissu tumoral paraît particulièrement intéressante et pourrait permettre d'identifier les patients réfractaires ou rechuteurs précoces.

## PERSPECTIVES

Nos données doivent faire l'objet d'une confirmation, dans un premier temps dans une large étude rétrospective avec validation des résultats dans une cohorte indépendante, puis dans un second temps, dans une étude prospective dédiée. Les données d'expression génique générées doivent être validées à l'échelle protéique par IHC lorsque l'anticorps est disponible. Par ailleurs, il est essentiel de mettre au point un panel de gènes spécifiques au lymphome de Hodgkin classique, avec des gènes spécifiques à la cellule de HRS et surtout des gènes reflétant l'hétérogénéité du microenvironnement tumoral.

Du fait de la rareté des cellules de HRS au sein de l'infiltrat inflammatoire abondant, et le fait que l'on travaille sur du tissu non microdisséqué, il sera essentiel de comparer les résultats de GEP des tumeurs à des lignées cellulaires de LHc et des cellules du microenvironnement.

Enfin le but de ce travail serait de mettre au point un score pronostic moléculaire prédictif de résistance au traitement de première ligne, qui pourrait être combiné à une évaluation par TEP intermédiaire.

# ANNEXES

## **Annexe 1 : Classification Ann Arbor modifiée selon *Costwolds***

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

Stade II : Atteinte de deux ou plusieurs groupes ganglionnaires d'un seul côté du diaphragme.

Le nombre de territoires ganglionnaires est indiqué en indice

Stade III : Atteinte ganglionnaire des deux côtés du diaphragme

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

A : Absence de signes généraux

B : Présence de plusieurs signes généraux

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

X : masse tumorale volumineuse

E : Atteinte par contiguïté

## **Annexe 2 : Facteurs pronostics LYSA/EORTIC pour les stades I et II**

- Age  $\geq$  50 ans
- VS  $\geq$  30mm 1<sup>ère</sup> heure (présence de symptômes B) ou  $\geq$  50mm 1<sup>ère</sup> heure (absence de symptômes B)
- Index médiastino-thoracique  $\geq$  0.35
- Nombre d'aires ganglionnaires atteintes  $\geq$  4

Formes favorables : absence de facteurs de risque

Formes défavorables : présence d'au moins un facteur de risque

### **Annexe 3 : Facteurs de risque GHSG**

- Atteinte extra-nodale
- VS  $\geq 30$ mm 1<sup>ère</sup> heure (présence de symptômes B) ou  $\geq 50$ mm 1<sup>ère</sup> heure (absence de symptômes B)
- Index médiastino-thoracique  $\geq 0.33$
- Nombre d'aires ganglionnaires atteintes  $\geq 3$

#### Formes localisées

- Stades IA, IB, IIA et IIB sans facteurs de risque

#### Formes intermédiaires :

- Stades IA, IB et IIA  $\geq$  un facteur
- Stade IIB  $\geq$  un facteur de risque sans bulk médiastinal ou atteinte extra-nodale

#### Formes avancées :

- Stade IIB avec sans bulk médiastinal ou atteinte extra-nodale
- Stades III et IV

### **Annexe 4 : Index Pronostic International pour les stades III et IV**

- Age  $> 45$  ans
- Sexe masculin
- Stade IV
- Albuminémie  $< 40$  g/L
- Hémoglobine  $< 10,5$  g/L
- Leucocytes  $> 15 \times 10^9 / L$
- Lymphopénie  $< 0.6 \times 10^9 / L$  ou  $< 8\%$

## Annexe 5 : Score de Deauville

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

## Annexe 6 : Critères de réponse selon IWG

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

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

## Annexe 7 : Résultats d'IHC pour les anticorps PD1, PD-L1, CD4, CD8, CD68, CD163, XPO1 et EBER

Patients RC	TMA	N°spot dans TMA	Richesse cellules tumorales	PD1	PDL1	CD4	CD8	CD68	CD163	XPO1	EBER
1	1	S1	++	+10%	+++90%	+++60%	+++70	++30%	+++80%	+	+
2	1	S4	++	+5%	++70%	++30%	+5%	++20%	+++70%	+	-
3	2	S1	+	5%	+++70%	+++40%	++15%	++25%	+++40%	++	-
4	2	S3	+++	+10%	+++70%	+++70%	+++15%	++25%	+++20%	++	-
5	4	S3	++	+10%	+++90%	+++70%	+++40%	+++40%	+++25%	+++	+
6	4	S4	+++	+15%	+++80%	+++50%	+++50%	+++25%	+++20%	+	+
7	4	S2	++	+10%	+++70%	++50%	++10%	++25%	+++50%	++	-
8	2	S4	+	+1%	+++70%	++30%	++10%	++60%	+++90%	++	-
9	3	S1	++	+20%	++60%	+++40%	++15%	+++15%	+++25%	+	-
10	3	S2	++	+5%	+++70%	+++90%	+++20	++15%	+++30%	+++	-
13	5	S3	++	++10%	++80%	+++60%	++20%	++20%	+++35%	+++	-
14	5	S4	++	+5%	+++80%	+++70%	++10%	++35%	+++30%	+++	-
15	6	S1	+	+10%	+++80%	+++70%	++15%	++30%	+++70%	++	-
17	6	S4	+	++30%	+5%	+++40%	++40%	++20%	++25%	++15%	+
19	7	S2	+++	+20%	++20%	++60%	++10%	++20%	+++10%	+++	-

Patients RR	TMA	N°spot dans TMA	Richesse cellules tumorales	PD1	PDL1	CD4	CD8	CD68	CD163	XPO1	EBER
1	1	S2	++	+2%	++80%	+++70%	+10%	+15%	+++10%	++	-
2	2	S2	+	+10%	+++80%	++40%	+++50%	++30%	+++70%	++	+
3	3	S3	++	-	+++80%	+15%	++15%	++40%	+++70%	+++	-
4	4	S1	++	+10%	++70%	++20%	++10%	++30%	+++70%	+++	-
5	7	S4	+++	+5%	+++70%	+++60%	++20%	+++10%	++20%	++	-
6	12	S1	++	+10%	+++90%	+80%	+15%	++15%	+5%	+++	-
7	13	S4	++	+5%	+++100%	++80%	+++15%	++15%	+++25%	+++	+
8	14	S2	++	+10%	++90%	+++70%	+++5%	++10%	+++1%	+++	+
10	8	S4	++	+10%	++50%	++30%	++20%	++10%	+++40%	+++	-



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018: Cancer Statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* janv 2018;68(1):7-30.
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 19 mai 2016;127(20):2375-90.
3. Mathas S, Hartmann S, Küppers R. Hodgkin lymphoma: Pathology and biology. *Semin Hematol.* juill 2016;53(3):139-47.
4. Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci.* 8 nov 1994;91(23):10962-6.
5. Irsch J, Wolf J, Tesch H, Diehl V, Radbruch A, Staratschek-Jox A. Class switch recombination was specifically targeted to immunoglobulin (Ig)G4 or IgA in Hodgkin's disease-derived cell lines. *Br J Haematol.* juin 2001;113(3):785-93.
6. Kanzler H. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med.* 1 oct 1996;184(4):1495-505.
7. Küppers R, Engert A, Hansmann M-L. Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest.* 1 oct 2012;122(10):3439-47.
8. Mancao C, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood.* 15 nov 2007;110(10):3715-21.
9. Bechtel D. Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood.* 15 déc 2005;106(13):4345-50.
10. Weniger MA, Küppers R. NF- $\kappa$ B deregulation in Hodgkin lymphoma. *Semin Cancer Biol.* août 2016;39:32-9.
11. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, et al. Constitutive Nuclear Factor- $\kappa$ B-RelA Activation Is Required for Proliferation and Survival of Hodgkin's Disease Tumor Cells. :9.
12. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, et al. Nuclear Factor  $\kappa$ B-dependent Gene Expression Profiling of Hodgkin's Disease Tumor Cells, Pathogenetic Significance, and Link to Constitutive Signal Transducer and Activator of Transcription 5a Activity. *J Exp Med.* 2 sept 2002;196(5):605-17.
13. Jundt F. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 1 mai 2002;99(9):3398-403.

14. Chiu A, Xu W, He B, Dillon SR, Gross JA, Sievers E, et al. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood*. 15 janv 2007;109(2):729-39.
15. Gires O. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J*. 1 juin 1999;18(11):3064-73.
16. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, Rodig SJ, Takeyama K, Abramson J, et al. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci*. 7 août 2007;104(32):13134-9.
17. Skinnider BF. Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 15 janv 2002;99(2):618-26.
18. Joos S, pper MK, Ohl S, Marynen P, Moller P, Pfreundschuh M. Genomic Imbalances Including Amplification of the Tyrosine Kinase Gene JAK2 in CD30% Hodgkin Cells. *Cancer Res*. 2000 Feb 1;60(3):549-52.
19. Weniger MA, Melzner I, Menz CK, Wegener S, Bucur AJ, Dorsch K, et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*. avr 2006;25(18):2679-84.
20. Renne C. Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 15 mai 2005;105(10):4051-9.
21. Zheng B. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood*. 3 avr 2003;102(3):1019-27.
22. Dutton A, Reynolds GM, Dawson CW, Young LS, Murray PG. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J Pathol*. mars 2005;205(4):498-506.
23. Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Mills GB, Younes A. Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 29 nov 2005;0(0):051220022257008.
24. Schmitz R, Stanelle J, Hansmann M-L, Küppers R. Pathogenesis of Classical and Lymphocyte-Predominant Hodgkin Lymphoma. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. févr 2009;4(1):151-74.
25. Ushmorov A. Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 15 mars 2006;107(6):2493-500.
26. Re D, schen MM, Ahmadi T, Wickenhauser C, Staratschek-Jox A, Holtick U, et al. Oct-2 and Bob-1 Deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg Cells. 2001;6.
27. Torlakovic E, Tierens A, Dang HD, Delabie J. The Transcription Factor PU.1, Necessary for B-Cell Development Is Expressed in Lymphocyte Predominance, But Not Classical Hodgkin's Disease. *Am J Pathol*. nov 2001;159(5):1807-14.
28. Mathas S, Janz M, Hummel F, Hummel M, Wollert-Wulf B, Lusatis S, et al. Intrinsic

inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol.* févr 2006;7(2):207-15.

29. Radtke F, Wilson A, Mancini SJC, MacDonald HR. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* mars 2004;5(3):247-53.

30. Jundt F, Acikgöz ö, Kwon S-H, Schwarzer R, Anagnostopoulos I, Wiesner B, et al. Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia.* août 2008;22(8):1587-94.

31. Martin-Subero JI, Klapper W, Sotnikova A, Callet-Bauchu E, Harder L, Bastard C, et al. Chromosomal Breakpoints Affecting Immunoglobulin Loci Are Recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin Lymphoma. *Cancer Res.* 1 nov 2006;66(21):10332-8.

32. Szymanowska N, Klapper W, Gesk S, Küppers R, Martín-Subero JI, Siebert R. BCL2 and BCL3 are recurrent translocation partners of the IGH locus. *Cancer Genet Cytogenet.* oct 2008;186(2):110-4.

33. Barth TFE. Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 1 mai 2003;101(9):3681-6.

34. Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarrett RF, Hay RT. Mutations in the I $\kappa$ B $\alpha$  gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I $\kappa$ B $\alpha$ . :8.

35. Emmerich F, Meiser M, Hummel M, Demel G, Foss H-D, Jundt F, et al. Overexpression of I Kappa B Alpha Without Inhibition of NF- $\kappa$ B Activity and Mutations in the I Kappa B Alpha Gene in Reed-Sternberg Cells. :7.

36. Jungnickel B, Staratschek-Jox A, Brauninger A, Spieker T, Wolf J, Diehl V, et al. Clonal Deleterious Mutations in the I b Gene in the Malignant Cells in Hodgkin's Lymphoma. *J Exp Med.* 17 janv 2000;191(2):395-402.

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

38. Mottok A, Renne C, Willenbrock K, Hansmann M-L, Brauninger A. Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood.* 1 nov 2007;110(9):3387-90.

39. Hartmann S, Martin-Subero JI, Gesk S, Husken J, Giefing M, Nagel I, et al. Detection of genomic imbalances in microdissected Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma by array-based comparative genomic hybridization. *Haematologica.* 1 sept 2008;93(9):1318-26.

40. Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O'Donnell E, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood.* 28 oct 2010;116(17):3268-77.

41. Re D, Hofmann A, Wolf J, Diehl V, Staratschek-Jox A. Cultivated H-RS cells are resistant to CD95L-mediated apoptosis despite expression of wild-type CD95. *Exp Hematol.* 2000;5.
42. Thomas RK, Schmitz R, Harttrampf AC, Abdil-Hadi A, Wickenhauser C, Distler V, et al. Apoptosis-resistant phenotype of classical Hodgkin's lymphoma is not mediated by somatic mutations within genes encoding members of the death-inducing signaling complex (DISC). *Leukemia.* juin 2005;19(6):1079-82.
43. Maggio EM, van den Berg A, de Jong D, Diepstra A, Poppema S. Low Frequency of FAS Mutations in Reed-Sternberg Cells of Hodgkin's Lymphoma. *Am J Pathol.* janv 2003;162(1):29-35.
44. Schen MM, Re D, Brauninger A, Peters RK, Rajewsky K. Somatic Mutations of the CD95 Gene in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells. 2000;5.
45. Straus SE. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood.* 1 juill 2001;98(1):194-200.
46. Dutton A, O'Neil JD, Milner AE, Reynolds GM, Starczynski J, Crocker J, et al. Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. *Proc Natl Acad Sci.* 27 avr 2004;101(17):6611-6.
47. Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I, Hummel F, Wiesner B, Janz M, et al. c-FLIP Mediates Resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg Cells to Death Receptor-induced Apoptosis. *J Exp Med.* 19 avr 2004;199(8):1041-52.
48. Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature.* 17 mars 2011;471(7338):377-81.
49. Diepstra A, van Imhoff GW, Karim-Kos HE, van den Berg A, te Meerman GJ, Niens M, et al. HLA Class II Expression by Hodgkin Reed-Sternberg Cells Is an Independent Prognostic Factor in Classical Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol.* 20 juill 2007;25(21):3101-8.
50. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, Giulino-Roth L, Tam W, Liu Y, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood.* 12 févr 2015;125(7):1061-72.
51. Otto C, Giefing M, Massow A, Vater I, Gesk S, Schlesner M, et al. Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* juin 2012;157(6):702-8.
52. Martin-Subero JI. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 15 févr 2002;99(4):1474-7.
53. Schneider M, Schneider S, Zühlke-Jenisch R, Klapper W, Sundström C, Hartmann S, et al. Alterations of the CD58 gene in classical Hodgkin lymphoma: CD58 in Hodgkin Lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* oct 2015;54(10):638-45.
54. Kapp U. Hodgkin's Lymphoma-Derived Tissue Serially Transplanted Into Severe Combined

Immunodeficient Mice. *Blood*. 1993 Aug 15;82(4):1247-56.

55. Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, Emmerich F, Iler GM, Foss H-D, et al. Hodgkin/Reed-Sternberg Cells Induce Fibroblasts to Secrete Eotaxin, a Potent Chemoattractant for T Cells and Eosinophils. *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):2065-71.

56. Carbone A, Gloghini A, Gruss H-J, Pinto A, areas H. CD40 Ligand Is Constitutively Expressed in a Subset of T Cell Lymphomas and on the Microenvironmental Reactive T Cells of Follicular Lymphomas and Hodgkin's Disease. :11.

57. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting Edge: Control of CD8+ T Cell Activation by CD4+CD25+ Immunoregulatory Cells. *J Immunol*. 1 août 2001;167(3):1137-40.

58. Marshall NA. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 1 mars 2004;103(5):1755-62.

59. Newcom SR, Gu L. Transforming growth factor p1 messenger RNA in Reed-Sternberg cells in nodular sclerosing Hodgkin's disease. :4.

60. Gandhi MK, Moll G, Smith C, Dua U, Lambley E, Ramuz O, et al. Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 15 août 2007;110(4):1326-9.

61. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, Sakai T, Hishizawa M, Tashima M, et al. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 15 mars 2008;111(6):3220-4.

62. Enblad G, Molin D, Glimelius I, Fischer M, Nilsson G. The Potential Role of Innate Immunity in the Pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. oct 2007;21(5):805-23.

63. Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol*. 20 déc 2006;60(12):1342-9.

64. Kilger E. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J*. 16 mars 1998;17(6):1700-9.

65. Kuppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology*. 1 janv 2009;2009(1):491-6.

66. Poppema S, van den Berg A. Interaction between host T cells and Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas. *Semin Cancer Biol*. oct 2000;10(5):345-50.

67. Skinnider BF. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 1 janv 2001;97(1):250-5.

68. Terabe M, Park JM, Berzofsky JA. Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer Immunol Immunother*. 1 févr 2004;53(2):79-85.

69. Atayar Ç, Poppema S, Blokzijl T, Harms G, Boot M, van den Berg A. Expression of the T-Cell Transcription Factors, GATA-3 and T-bet, in the Neoplastic Cells of Hodgkin Lymphomas. *Am J Pathol*. janv 2005;166(1):127-34.

70. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol.* 1989 Nov;7(11):1630-6.
71. Noordijk EM, Carde P, Dupouy N, Hagenbeek A, Krol ADG, Kluin-Nelemans JC, et al. Combined-Modality Therapy for Clinical Stage I or II Hodgkin's Lymphoma: Long-Term Results of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer H7 Randomized Controlled Trials. *J Clin Oncol.* juill 2006;24(19):3128-35.
72. A Prognostic Score for Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med.* 1998 Nov 19;339(21):1506-14.
73. Gallamini A, Hutchings M, Rigacci L, Specht L, Merli F, Hansen M, et al. Early Interim 2-[<sup>18</sup>F]Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography Is Prognostically Superior to International Prognostic Score in Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma: A Report From a Joint Italian-Danish Study. *J Clin Oncol.* 20 août 2007;25(24):3746-52.
74. Chemotherapy plus Involved-Field Radiation in Early-Stage Hodgkin's Disease. *N Engl J Med.* 2007 Nov 8;357(19):1916-27.
75. Reduced Treatment Intensity in Patients with Early-Stage Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 2010 Aug 12;363(7):640-52.
76. Eich HT, Diehl V, Gørgen H, Pabst T, Markova J, Debus J, et al. Intensified Chemotherapy and Dose-Reduced Involved-Field Radiotherapy in Patients With Early Unfavorable Hodgkin's Lymphoma: Final Analysis of the German Hodgkin Study Group HD11 Trial. *J Clin Oncol.* 20 sept 2010;28(27):4199-206.
77. Van Den Neste E, Casasnovas O, Andre M, Touati M, Senecal D, Edeline V, et al. Classical Hodgkin's lymphoma: the Lymphoma Study Association guidelines for relapsed and refractory adult patients eligible for transplant. *Haematologica.* 1 août 2013;98(8):1185-95.
78. Meignan M, Barrington S, Itti E, Gallamini A, Haioun C, Polliack A. Report on the 4th International Workshop on Positron Emission Tomography in Lymphoma held in Menton, France, 3-5 October 2012. *Leuk Lymphoma.* janv 2014;55(1):31-7.
79. Van Den Neste E, Casasnovas O, Andre M, Touati M, Senecal D, Edeline V, et al. Classical Hodgkin's lymphoma: the Lymphoma Study Association guidelines for relapsed and refractory adult patients eligible for transplant. *Haematologica.* 1 août 2013;98(8):1185-95.
80. Gordon LI, Hong F, Fisher RI, Bartlett NL, Connors JM, Gascoyne RD, et al. Randomized Phase III Trial of ABVD Versus Stanford V With or Without Radiation Therapy in Locally Extensive and Advanced-Stage Hodgkin Lymphoma: An Intergroup Study Coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group (E2496). *J Clin Oncol.* 20 févr 2013;31(6):684-91.
81. Gordon LI, Hong F, Fisher RI, Bartlett NL, Connors JM, Gascoyne RD, et al. Randomized Phase III Trial of ABVD Versus Stanford V With or Without Radiation Therapy in Locally Extensive and Advanced-Stage Hodgkin Lymphoma: An Intergroup Study Coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group (E2496). *J Clin Oncol.* 20 févr 2013;31(6):684-91.

82. Engert A, Diehl V, Franklin J, Lohri A, Dörken B, Ludwig W-D, et al. Escalated-Dose BEACOPP in the Treatment of Patients With Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma: 10 Years of Follow-Up of the GHSg HD9 Study. *J Clin Oncol*. 20 sept 2009;27(27):4548-54.
83. Engert A, Haverkamp H, Kobe C, Markova J, Renner C, Ho A, et al. Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage Hodgkin's lymphoma (HD15 trial): a randomised, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet*. mai 2012;379(9828):1791-9.
84. Stamatoullas A, Brice P, Bouabdallah R, Mareschal S, Camus V, Rahal I, et al. Outcome of patients older than 60 years with classical Hodgkin lymphoma treated with front line ABVD chemotherapy: frequent pulmonary events suggest limiting the use of bleomycin in the elderly. *Br J Haematol*. juill 2015;170(2):179-84.
85. Evens AM, Helenowski I, Ramsdale E, Nabhan C, Karmali R, Hanson B, et al. A retrospective multicenter analysis of elderly Hodgkin lymphoma: outcomes and prognostic factors in the modern era. *Blood*. 19 janv 2012;119(3):692-5.
86. Boll B, Bredenfeld H, Gorgen H, Halbsguth T, Eich HT, Soekler M, et al. Phase 2 study of PVAG (prednisone, vinblastine, doxorubicin, gemcitabine) in elderly patients with early unfavorable or advanced stage Hodgkin lymphoma. *Blood*. 8 déc 2011;118(24):6292-8.
87. Devilard E. Gene expression profiling defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease. *Oncogene*. 2002 May 2;21(19):3095-102.
88. Sanchez-Aguilera A. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 15 juill 2006;108(2):662-8.
89. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 11 mars 2010;362(10):875-85.
90. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, Esterni B, Stamatoullas A, Picquenot JM, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood*. 23 janv 2009;113(12):2765-3775.
91. Sanchez-Espiridion B, Montalban C, Lopez A, Menarguez J, Sabin P, Ruiz-Marcellan C, et al. A molecular risk score based on 4 functional pathways for advanced classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 26 août 2010;116(8):e12-7.
92. Sánchez-Espiridión B, Sánchez-Aguilera A, Montalbán C, Martín C, Martínez R, González-Carrero J, et al. A TaqMan Low-Density Array to Predict Outcome in Advanced Hodgkin's Lymphoma Using Paraffin-Embedded Samples. *Clin Cancer Res*. 15 févr 2009;15(4):1367-75.
93. Scott DW, Chan FC, Hong F, Rogic S, Tan KL, Meissner B, et al. Gene Expression-Based Model Using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Biopsies Predicts Overall Survival in Advanced-Stage Classical Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*. 20 févr 2013;31(6):692-700.
94. Steidl C, Diepstra A, Lee T, Chan FC, Farinha P, Tan K, et al. Gene expression profiling of microdissected Hodgkin Reed-Sternberg cells correlates with treatment outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 25 oct 2012;120(17):3530-40.

95. Agostinelli C, Gallamini A, Stracqualursi L, Agati P, Tripodo C, Fuligni F, et al. The combined role of biomarkers and interim PET scan in prediction of treatment outcome in classical Hodgkin's lymphoma: a retrospective, European, multicentre cohort study. *Lancet Haematol.* oct 2016;3(10):e467-79.
96. Schouten JP. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 15 juin 2002;30(12):57e - 57.
97. Eldering E. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res.* 1 déc 2003;31(23):153e - 153.
98. Mareschal S, Ruminy P, Bagacean C, Marchand V, Cornic M, Jais J-P, et al. Accurate Classification of Germinal Center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and Rapid Reverse Transcriptase-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay. *J Mol Diagn.* mai 2015;17(3):273-83.
99. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma. *J Clin Oncol.* 10 févr 2007;25(5):579-86.
100. Bobée V, Ruminy P, Marchand V, Viailly P-J, Abdel Sater A, Veresezan L, et al. Determination of Molecular Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Reverse Transcriptase Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Classifier. *J Mol Diagn.* nov 2017;19(6):892-904.
101. Klein JL, Nguyen TT, Bien-Willner GA, Chen L, Foyil KV, Bartlett NL, et al. CD163 Immunohistochemistry Is Superior to CD68 in Predicting Outcome in Classical Hodgkin Lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 1 mars 2014;141(3):381-7.
102. Hollander P, Kamper P, Smedby KE, Enblad G, Ludvigsen M, Mortensen J, et al. High proportions of PD-1<sup>+</sup> and PD-L1<sup>+</sup> leukocytes in classical Hodgkin lymphoma microenvironment are associated with inferior outcome. *Blood Adv.* 8 août 2017;1(18):1427-39.
103. Rui L, Emre NCT, Kruhlik MJ, Chung H-J, Steidl C, Slack G, et al. Cooperative Epigenetic Modulation by Cancer Amplicon Genes. *Cancer Cell.* déc 2010;18(6):590-605.
104. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, et al. Induction of Apoptosis in Fibroblasts by c-myc Protein. *Cell.* 1992 Apr 3;69(1):119-28.
105. Yuan Y, Kluiver J, Koerts J, de Jong D, Rutgers B, Abdul Razak FR, et al. miR-24-3p Is Overexpressed in Hodgkin Lymphoma and Protects Hodgkin and Reed-Sternberg Cells from Apoptosis. *Am J Pathol.* juin 2017;187(6):1343-55.
106. Friedman KM, Garrett TE, Evans JW, Horton HM, Latimer HJ, Seidel SL, et al. Effective Targeting of Multiple B-Cell Maturation Antigen-Expressing Hematological Malignancies by Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Hum Gene Ther.* mai 2018;29(5):585-601.



## RÉSUMÉ

Le lymphome de Hodgkin (LH) est l'un des lymphomes les plus fréquents. Le pronostic demeure excellent au prix d'un lourd traitement. Les paramètres pronostics classiques ne permettent pas d'identifier les patients à risque de résistance au traitement de première ligne. Les facteurs pronostics biologiques tendent à se développer avec plusieurs études mettant en évidence leurs pertinence. L'étude du profil d'expression génique ou *gene expression profiling* (GEP) de l'ensemble du tissu tumoral a permis d'introduire une nouvelle approche dans l'étude des biomarqueurs. Dans la présente étude exploratoire rétrospective, nous rapportons pour la première fois l'utilisation de la technique RT-MLPA couplée au séquençage « NGS » dans une cohorte de 40 d'échantillons de LHc, en rémission complète (RC) ou en rechute et/ou réfractaires (RR) après traitement de première ligne. Nous avons sélectionné 21 patients en RC et 19 en RR. Au total 38 ARN ont été analysés, 19 dans le groupe RR, et 19 dans le groupe RC et 33 données d'expression génique ont pu être générées. A partir d'un panel de 137 gènes ayant un intérêt diagnostique ou pronostic dans le lymphome, nous avons sélectionné 15 gènes présentant une différence d'expression génique statistiquement significative entre les deux groupes RC et RR : *BCL6*, *BCMA*, *CCDC50*, *CD40*, *CD86*, *CD95*, *CRBN*, *ICOS*, *KI67*, *MEF2B*, *MYBL1*, *MYC*, *MYD88*, *Imu.alpha* et *XPO1*. Après correction de Bonferroni, 2 gènes ont été sélectionnés : *BCMA* ( $p=0.0375$ ) et *MYC* ( $p=0.0378$ ). Les données d'expression génique de 8 gènes ont pu être comparé à l'échelle protéique par IHC. Il existait une très bonne corrélation pour PD1 (ICC = 0.574,  $p=0.002$ ), CD163 (ICC = 0.434,  $p=0.02$ ) et une bonne corrélation pour EBER (coefficient de kappa = 0.75,  $p=0.05$ ). Les gènes *MYC* ( $p=0.0027$ ) et *BCMA* ( $p=0.002$ ) étaient surexprimés dans le groupe de patients RR. Les survies globales et sans progression ont été évaluées, en fonction de l'expression génique des gènes *MYC* et *BCMA* par un modèle de Cox. Une courbe ROC a permis de définir la meilleure valeur seuil permettant de distinguer les deux groupes RC et RR. Il existait une différence de survie globale et de survie sans progression en fonction de l'expression génique de *BCMA* ( $p=0.0142$  et  $p=0.014$ ). Il n'existait pas de différence de survie globale en fonction de l'expression de *MYC* ( $p=0.259$ ). Par contre il existait une différence de survie sans progression en fonction de l'expression de *MYC* ( $p=0.00327$ ). Enfin nous avons proposé un algorithme de classification afin de classer les patients en RC ou en RR en fonction de l'expression de *MYC* et *BCMA*.

**MOTS-CLÉS :** Lymphome de Hodgkin classique, profil d'expression génique, RT-MLPA « NGS », *MYC*, *BCMA*.