



**HAL**  
open science

# Expression de la GAPDH dans les lymphomes B diffus à grandes cellules

Julie Reverso-Meinietti

► **To cite this version:**

Julie Reverso-Meinietti. Expression de la GAPDH dans les lymphomes B diffus à grandes cellules. Médecine humaine et pathologie. 2017. dumas-01986242

**HAL Id: dumas-01986242**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01986242>**

Submitted on 18 Jan 2019

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

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

UNIVERSITÉ DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NICE

THÈSE D'EXERCICE EN MÉDECINE

---

# EXPRESSION DE LA GAPDH DANS LES LYMPHOMES B DIFFUS À GRANDES CELLULES

---

Présentée et soutenue publiquement à Nice le vendredi 9 Juin 2017

Par **Julie REVERSO-MEINIETTI**

**Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine**

Diplôme d'État

Examineurs de la Thèse :

Président du Jury :

**Monsieur le Professeur Jean-François MICHIELS**

Assesseurs :

**Monsieur le Professeur Nicolas MOUNIER**

**Madame le Professeur Catherine THIEBLEMONT**

**Monsieur le Docteur Jean-Ehrland RICCI**

Directeur de Thèse :

**Monsieur le Docteur Damien AMBROSETTI**

Année 2016-2017



UNIVERSITÉ DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NICE

THÈSE D'EXERCICE EN MÉDECINE

---

# EXPRESSION DE LA GAPDH DANS LES LYMPHOMES B DIFFUS À GRANDES CELLULES

---

Présentée et soutenue publiquement à Nice le vendredi 9 Juin 2017

Par **Julie REVERSO-MEINIETTI**

**Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine**

Diplôme d'État

Examineurs de la Thèse :

Président du Jury :

**Monsieur le Professeur Jean-François MICHIELS**

Assesseurs :

**Monsieur le Professeur Nicolas MOUNIER**

**Madame le Professeur Catherine THIEBLEMONT**

**Monsieur le Docteur Jean-Ehrland RICCI**

Directeur de Thèse :

**Monsieur le Docteur Damien AMBROSETTI**

UNIVERSITÉ NICE-SOPHIA ANTIPOLIS  
FACULTÉ DE MÉDECINE

**Liste des professeurs au 1<sup>er</sup> septembre 2016 à la Faculté de Médecine de Nice**

Doyen	M. BAQUÉ Patrick
Vice-Doyen	M. BOILEAU Pascal
Assesseurs	M. ESNAULT Vincent
	M. CARLES Michel
	Mme BREUIL Véronique
	M. MARTY Pierre
Conservateur de la bibliothèque	Mme DE LEMOS Annelise
Directrice administrative des services	Mme CALLEA Isabelle
Doyens Honoraires	M. AYRAUD Noël
	M. RAMPAL Patrick
	M. BENCHIMOL Daniel

**PROFESSEURS HONORAIRES**

M ALBERTINI Marc

M. BALAS Daniel

M. BATT Michel

M. BLAIVE Bruno

M. BOQUET Patrice

M. BOURGEON André

M. BOUTTÉ Patrick

M. BRUNETON Jean-Noël

Mme BUSSIERE Françoise

M. CAMOUS Jean-Pierre

M. CANIVET Bertrand

M. CASSUTO Jill-patrice

M. CHATEL Marcel

M. COUSSEMENT Alain

Mme CRENESSE Dominique

M. DARCOURT Guy

M. DELLAMONICA Pierre

M. DELMONT Jean

M. DEMARD François

M. DOLISI Claude

M. FRANCO Alain

M. FREYCHET Pierre

M. GÉRARD Jean-Pierre

M. GILLET Jean-Yves

M. GRELLIER Patrick

M. GRIMAUD Dominique

M. HARTER Michel

M. INGLESAKIS Jean-André

M. JOURDAN Jacques

M. LALANNE Claude-Michel

M. LAMBERT Jean-Claude

M. LAZDUNSKI Michel

M. LEFEBVRE Jean-Claude

M. LE BAS Pierre

M. LE FICHOUX Yves

Mme LEBRETON Elisabeth

M. LOUBIERE Robert

M. MARIANI Roger

M. MASSEYEFF René

M. MATTEI Mathieu

M. MOUIEL Jean

Mme MYQUEL Martine

M. OLLIER Amédée

M. ORTONNE Jean-Paul

M. SAUTRON Jean Baptiste

M. SCHNEIDER Maurice

M. TOUBOL Jacques

M. TRAN Dinh Khiem

M VAN OBBERGHEN Emmanuel

M. ZIEGLER Gérard

**M.C.À. HONORAIRE**

Mlle ALLINE Madeleine

**M.C.U. HONORAIRES**

M. ARNOLD Jacques  
 M. BASTERIS Bernard  
 Mlle CHICHMANIAN Rose-Marie  
 Mme DONZEAU Michèle  
 M. EMILIOZZI Roméo  
 M. FRANKEN Philippe  
 M. GASTAUD Marcel  
 M.GIRARD-PIPAU Fernand  
 M. GIUDICELLI Jean  
 M. MAGNÉ Jacques  
 Mme MEMRAN Nadine  
 M. MENGUAL Raymond  
 M. PHILIP Patrick  
 M. POIRÉE Jean-Claude  
 Mme ROURE Marie-Claire

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M. AMIEL Jean	Urologie (52.04)
M. BENCHIMOL Daniel	Chirurgie Générale (53.02)
M. BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M. DARCOURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M. DESNUELLE Claude	Biologie Cellulaire (44.03)
Mme EULLER-ZIEGLER Liana	Rhumatologie (50.01)
M. FENICHEL Patrick	Biologie du Développement et de la Reproduction (54.05)
M. FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M. GASTAUD Pierre	Ophtalmologie (55.02)
M. GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M. HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M. HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M. HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M. LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénérologie (50.03)
M. LEFTHERIOTIS Geogres	Physiologie- médecine vasculaire
M. MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M. MICHIELS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M. MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
Mme PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M. PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
M. PRINGUEY Dominique	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M. QUATREHOMME Gérald	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M. RAUCOULES-AIMÉ Marc	Anesthésie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M. ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M. SANTINI Joseph	O.R.L. (55.01)
M. THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M. TRAN Albert	Hépto Gastro-entérologie (52.01)

**PROFESSEURS PREMIERE CLASSE**

Mme ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M. BAQUÉ Patrick	Anatomie - Chirurgie Générale (42.01)
M. BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M. BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)
M. BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
Mme BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie – Génétique (47.02)
M. BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
M. CASTILLO Laurent	O.R.L. (55.01)
M. DE PERETTI Fernand	Anatomie-Chirurgie Orthopédique (42.01)
M. DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M. ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
M. FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M. FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M. GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M. GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
M. HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
Mme ICHAI Carole	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M. LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M. MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M. MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M. PADOVANI Bernard	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M. PRADIER Christian	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention (46.01)
Mme RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M. ROSENTHAL Éric	Médecine Interne (53.01)
M. SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M. STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M. THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)

**PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE**

M. BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme BAILLIF Stéphanie	Ophtalmologie (55.02)
M. BENIZRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
M. BENOIT Michel	Psychiatrie (49.03)
M. BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
Mlle BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M. CARLES Michel	Anesthésiologie Réanimation (48.01)
M. CHEVALIER Nicolas	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M. CHEVALLIER Patrick	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
Mme CHINETTI Giulia	Biochimie-Biologie Moléculaire (44.01)
M. DELLAMONICA Jean	Réanimation médicale (48.02)
M. DELOTTE Jérôme	Gynécologie-obstétrique (54.03)
M. FONTAINE Denys	Neurochirurgie (49.02)
M. FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)
Mlle GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
M. GUÉRIN Olivier	Gériatrie (48.04)
M. IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)
M JEAN BAPTISTE Elixène	Chirurgie vasculaire (51.04)

M. LEVRAUT Jacques	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M. PASSERON Thierry	Dermato-Vénérologie (50-03)
M. PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)
M. ROGER Pierre-Marie	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M. ROHRlich Pierre	Pédiatrie (54.01)
M. ROUX Christian	Rhumatologie (50.01)
M. RUI MY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme SACCONI Sabrina	Neurologie (49.01)
M. SADOUL Jean-Louis	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M. TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M. VENISSAC Nicolas	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)

#### **PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS**

M. H O FLIGER Philippe	Médecine Générale (53.03)
------------------------	---------------------------

#### **MAITRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS**

M. D À RMON David	Médecine Générale (53.03)
-------------------	---------------------------

#### **PROFESSEURS AGRÉGÉS**

Mme LANDI Rebecca	Anglais
Mme ROSE Patricia	Anglais

#### **MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mme ALUNNI Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M. AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M. BENOLIEL José	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)
Mme BUREL-VANDENBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M. DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
M DOYEN Jérôme	Radiothérapie (47.02)
M FAVRE Guillaume	Néphrologie (52.03)
M. FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M. GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme GIOVANNINI-CHAMI Lisa	Pédiatrie (54.01)
Mme HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
M. HUMBERT Olivier	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme LAMY Brigitte	Bactériologie-virologie ( 45.01)
Mme LEGROS Laurence	Hématologie et Transfusion (47.01)
Mme LONG-MIRA Elodie	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)
Mme MOCERI Pamela	Cardiologie (51.02)
Mme MUSSO-LASSALLE Sandra	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M. NAÏMI Mourad	Biochimie et Biologie moléculaire (44.01)
Mme POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
Mme SEITZ-POLSKI Barbara	Immunologie (47.03)
M. TESTA Jean	Épidémiologie Économie de la Santé et Prévention (46.01)
M. TOULON Pierre	Hématologie et Transfusion (47.01)

**PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE**

M. DURAND Matthieu Urologie (52.04)

**PROFESSEURS ASSOCIÉS**

M. GARDON Gilles Médecine Générale (53.03)  
 M. GONZALEZ Jean-François Chirurgie Orthopédique et traumatologie ( 50.02)  
 M. PAPA Michel Médecine Générale (53.03)  
 M. WELLS Michael Anatomie-Cytologie ( 42.03)

**MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS**

M BALDIN Jean-Luc Médecine Générale (53.03)  
 Mme CASTA Céline Médecine Générale (53.03)  
 Mme MONNIER Brigitte Médecine Générale (53.03)

**PROFESSEURS CONVENTIONNÉS DE L'UNIVERSITÉ**

M. BERTRAND François Médecine Interne  
 M. BROCKER Patrice Médecine Interne Option Gériatrie  
 M. CHEVALLIER Daniel Urologie  
 Mme FOURNIER-MEHOUAS Manuella Médecine Physique et Réadaptation  
 M. JAMBOU Patrick Coordination prélèvements d'organes  
 M. ODIN Guillaume Chirurgie maxilo-faciale  
 M. PEYRADE Frédéric Onco-Hématologie  
 M. PICCARD Bertrand Psychiatrie  
 M. QUARANTA Jean-François Santé Publique

## REMERCIEMENTS

À mon Maître et Président de ce jury, Monsieur le Pr Michiels,

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de présider ce jury, c'est un honneur pour moi de soumettre ce travail à votre regard aiguisé.

Je vous sais grée pour votre infinie patience à tenter tant bien que mal de transmettre avec passion, bienveillance et humour, votre immense savoir au cours de ces nombreuses heures, souvent tardives. Je me considère comme privilégiée d'avoir été l'élève d'un Chef de Service disponible, prévenant, à l'écoute et toujours de bon conseil.

À Monsieur le Pr Mounier,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de m'avoir permis d'effectuer mes premiers pas d'interne en toute sécurité, au sein d'un service exigeant mais où l'on n'est jamais seul. Votre disponibilité m'a permis de passer un semestre sans (trop de) stress. Vous m'avez également permis de rencontrer une équipe de Recherche dynamique et dont la collaboration a mené à ces résultats.

À Madame le Pr Thieblemont,

Vous avez accepté avec une grande gentillesse de me faire l'honneur de participer à ce jury. Soyez assurée, Madame le Professeur, de l'expression de mes plus profonds remerciements.

À Monsieur le Dr Jean-Ehrland Ricci,

Je te remercie de m'avoir accueillie dans ton équipe dynamique et de m'avoir orientée vers ce projet très stimulant. J'ai beaucoup appris pendant cette année de Master et j'espère que nous pourrons collaborer encore longtemps.

À Monsieur le Dr Damien Ambrosetti,

Je te remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse dont le sujet a, légèrement, dévié... Tu fais partie de ces personnes qui ne savent pas dire non (même s'il faut parfois insister...) et c'est probablement, du moins en partie, pour cela que les internes t'apprécient tant. Ta disponibilité et ton humour te placent dans les traces du Chef, il ne te reste plus qu'à laisser pousser la moustache ! Merci pour ton aide précieuse, tant pour la mise au point que pour l'interprétation de TOUTES ces immunos !!!

Au Dr Johanna Chiche,

Merci infiniment pour la qualité de ton encadrement, ta gentillesse, ta disponibilité, ton aide, l'étendue incroyable de tes connaissances scientifiques et pour tous ces bons moments partagés au cours de mon Master et même après !

Au Dr Briere,

Je vous remercie pour votre aide et la mise à disposition de matériel pour la réalisation de ce projet.

Au LYSA,

Pour nous avoir accordé leur confiance et permis de réaliser notre projet.

À l'INCA,

Pour avoir soutenu et financé en partie ce projet.

À l'ensemble des équipes du C3M pour leur aide et leur soutien.

**Aux médecins et personnes qui ont fait de moi une anapath, par ordre chronologique :**

**Le Service d'Onco-Hématologie :**

Au Dr Vinti, le rockeur au grand cœur, les visites avec vous étaient de véritables bouffées de bonne humeur,

Au Dr Karsenti, votre gentillesse n'a d'égale que votre flegme, les week-ends à St Roch passaient plus vite en votre compagnie,

Aux Drs Manone, Legros et Legrand, Pr Cassuto.

Aux infirmières, ASH et secrétaires.

**Le Service du LCAP Archet 2, ou l'Antenne de la Colline en Folie :**

À Anne, pour la qualité ( ;) ) de votre enseignement dispensé avec finesse et justesse. Grace à vous, je suis à jour sur les dernières recos de gynéco et les derniers potins...

À Marjorie, pour tous ces moments passés au multi-têtes, en macro ou en pause... ta bonne humeur et tes conseils avisés ont été précieux.

À Agnes, pour votre enseignement en cytologie.

<3 <3 pour l'équipe de secrétaires de choc, Steph et Elena, aussi folles qu'efficaces et l'équipe de tech adorable Mamie, Magic, Mag, Meumeu, Nini Pompon.

**Le Service du LPCE :**

Au Pr Hofman, pour l'accueil toujours chaleureux que vous m'avez réservé.

À Cathy, pour votre dynamisme et votre enthousiasme constants.

À Vero, pour ta gentillesse et tes compétences, notamment en cyto (et pour m'avoir libérée du J-1 !).

À Sandra, pour ta disponibilité et ton enseignement, notamment en ORL.

À Elodie, pour ta personnalité, toujours agréable même surchargée de boulot et pour m'avoir « dégrossie » en bio mol.

À Marius, pour le temps que tu m'as accordé au multi-tête et pour ton aide.

À Christelle et Jean-Marc, quelle déception de ne plus partager votre bureau rempli de bonne humeur !

À Kevin, le qualicien de loin le plus sympa que je connaisse ! ;)

À l'équipe de secrétaires, d'ingénieurs, de techniciens et d'ASH aussi gentils que professionnels.

### **Le Laboratoire d'Onco-Hématologie :**

Au Pr Raynaud, pour m'avoir accueillie avec affabilité dans votre service,

À Isabelle, Corinne et Danielle, pour m'avoir initiée à l'Art de la Cytologie en toute simplicité et bonne humeur.

À Maria pour m'avoir donné terriblement envie de visiter le Brésil.

À l'ensemble des techniciens, qui mettent l'ambiance, de jour comme de nuit.

Aux tech du LRR avec spéciale dédicace aux équipes de nuit, Sam, Mimi, Clem, Amélie, Claire, Cathy, Fanny, Pauline, Michel, Fred, Evan, Joan, Jean-Lo, Mika, toujours aux petits soins autour de la fufuz.

### **Le Service du LCAP Pasteur :**

À Marie-Christine, pour vos nombreux cours, une base indispensable à l'apprentissage de cette vaste spécialité digestive et pour leur mise en application quotidienne.

À Fanny, pour ton œil juste et précis, surtout dans la traque du BK ! Merci également d'avoir su rendre intéressant des dossiers pas forcément gégé mais que tu acceptes de corriger toujours volontiers.

À Nathalie, pour l'ensemble de ton œuvre. Ta malice n'a d'égale que l'étendue de ton savoir ! J'espère avoir l'occasion de profiter encore un moment de ton enseignement.

Au Dr Perrin, car il est plaisant d'apprendre la dermatopathologie ponctuée de cours d'Histoire.

À Max, pour ta gentillesse, ta façon délicate et désolée de me donner tort et tes connaissances presque aussi impressionnantes que celles du Chef en Hémato !

À l'équipe de secrétaires, d'ASH et de techniCHiennes qui aboient plus qu'elles ne mordent !

Big up à Sandrine et Arnaud pour leur investissement sans faille dans la réalisation de ce projet et sans presque jamais râler, je vous dois beaucoup ! MERCI !!!!

### **Le Service d'Anapath du CAL :**

À Isabelle, pour la confiance que vous m'avez accordée durant mon stage chez vous.

À Anne, pour votre bienveillance maternelle.

À Juliette, pour m'avoir soutenue (ou plutôt pour ne pas t'être trop moquée) dans mes diagnostics fous.

Aux secrétaires, Corinne et Mumu pour votre efficacité redoutable, à l'équipe de techniciens corvéables à merci ;) : les super blondes, Anaïs, Agathe et Sandy ; les Nicos, Damien, Aline et Fanie.

### **À celles qui me permettent de faire le lien entre l'anapath et l'amitié :**

À mes anciennes co-internes devenues chefs, grâce à vous, je n'ai pas trouvé qu'un métier, mais de véritables amies :

À Steph, beaucoup de choses nous rapprochent, on voit l'anapath et la vie de la même façon ! Merci d'être toujours d'accord avec mes diagnostics ;)

À Zoé, ce semestre à tes côtés a été tellement riche à tous les niveaux, en apprentissage, en potins mais surtout en calories ! Ta capacité à mener ta vie professionnelle et personnelle de front nous épate tous ! J'aimerais bien être un jour « une femme like you ! »

À Béro, toute jeune maman resplendissante ! Capable de briller aussi bien par ton sens aigu du diagnostic que par tes qualités de chanteuse de Rap. Ce DIU nous a permis de partager de nombreux bons moments.

À Sophie, un rire reconnaissable entre tous, je me sens tellement marrante avec toi ! Je crois qu'il doit rester quelques restos qui ne nous ont pas encore fichés et je serais extrêmement heureuse de les tester avec vous !

### **À mes co-internes :**

À mon premier co-interne, Julien, ou Pr Boyer, qui a su prendre la bonne décision, à savoir m'écouter ! ;) Tu es un puit de connaissances mais pense à en sortir de temps en temps... ;) Tant de galères partagées, merci de ne pas m'avoir abandonnée, seule un vendredi soir sur le parking de l'Archet devant le fantôme de ma 206, fraîchement embarquée !

À Mélanie, ou Mme Chazal ;) Tant de dynamisme et d'énergie positive dans une si petite femme ! Ta bonne humeur constante et ta volonté font de toi une personne géniale. J'adorerais travailler avec toi plus tard !

À Nouran, ou devrais-je dire « Coco », même si on n'a pas vraiment été co-interne ;) Merci pour ta bonne humeur et pour ces soirées chez toi ou au Ranch ;)

À Yuyu, Lydie, Coraline, Cédric, Laetitia, Caroline, Yaelle et Thomas.

**À mes amis,**

À ma troupe d'amour, sans qui cet internat aurait été tellement différent... Vous êtes devenus plus que des amis, une seconde famille.

Adeline, ta bonne humeur et ta joie de vivre te font rayonner. Tu es véritablement notre soleil. Ta détermination nous impressionne tous, j'espère qu'elle te mènera où tu le souhaites !

Alex, ma super coloc, aussi brillante qu'ingénue, cette expérience marseillaise aura été remplie de bons moments, de bons restos et de bonnes rigolades ! Merci à Marco, l'Homme performant ET excellent, d'illuminer ta vie.

Auré, ton sourire constant et tes blagues te rendent adorable. J'espère qu'à l'heure où tu me lis, on aura enfin réussi à soumettre nos dossiers SIDES ! Merci à Ludo de t'aimer, pour sa disponibilité, même à minuit et pour son flegme légendaire.

Céline, la plus résistante de toutes les urgentistes, viens on claque tout et on ouvre un Bar en Jamaïque ! Merci de me soutenir quand je râle, même quand tu trouves que c'est un peu abusé... Merci à Vincent de te soutenir au quotidien et pour ses qualités d'imitateur de sourd ou de Raph ;)

Marine, quel soulagement de penser que tu t'occuperas de mes parents et grands-parents ;) Ton calme et ta sérénité ont souvent permis l'apaisement général, aussi bien en tant que secrétaire du Bureau qu'en tant qu'amie. Merci à Thomas de te donner envie d'avancer ; l'essayer, c'est l'adopter !

Sonia, merci de nous avoir fait découvrir ton si beau pays. J'apprécie ton caractère bien trempé, ta franchise et ta bonne humeur. J'espère sincèrement que tu t'installeras dans le Sud, pas trop loin de nous !

Raphik, merci d'être toujours motivé pour tout, pour tes citations et tes blagues, parfois un peu (voire franchement !) douteuses... Tu nous auras manqué pendant ton semestre parisien ! Merci à Fanny de te rendre heureux.

Rom, tu aurais pu être portugais, le « ciment » du groupe comme dirait Céline... :D Ton énergie débordante et ta bonne humeur constante font de toi le pilier de cette troupe. Merci de m'avoir proposé de faire partie de ton équipe, c'était une des expériences les plus enrichissantes de cet internat et même de ma vie. Merci à Clem de te supporter (parce que des fois t'es fatiguant quand même ;) )

**À ma Clara adorée,**

Merci d'être une oreille à l'écoute, de jour comme de nuit, en toute circonstance. Ton amour de la fête, des apéros entre potes, de la belotte et de la danse bref de la vie quoi, font de toi une amie exceptionnelle. J'espère te garder près de moi encore longtemps ! Merci à Mika de faire de toi une femme et une maman comblées avec ton adorable Oscar et ton grain de riz qui a du bien grandir à l'heure où tu me lis !

À ma Sandy déjantée,

Merci d'être toi. Avec tes nombreuses qualités et tes rares défauts. Ne change pas, ta gentillesse, ta folie et même ton côté un peu têtu font de toi une personne entière et une amie géniale. Nos chemins se sont croisés par hasard mais ne se sépareront pas de sitôt. Merci de m'avoir honorée en faisant de moi la marraine de ton fils parfait ! Merci à Abdi de prendre soin de vous et pour ses raclettes d'anthologie.

Aux copains d'abord,

À ma Manel, mon amie de toujours. Même éloignée tu restes près de moi, dans mon cœur (oui c'est cucul et alors ???!). Tu es une femme exceptionnelle. Tu as été présente à toutes les étapes importantes de ma vie. J'espère sincèrement que tu prendras la décision raisonnable de venir t'installer sur la Côte d'Azur (tu vois, je suis moi-même raisonnable, j'accepte le Var voire même les Bouches du Rhône...).

À ma Ju, Ju brune, Ju a, Ju bis, etc. Quelle idée de t'installer à Paris... Même si on ne s'appelle pas autant que je l'aimerais, rien ne change entre nous, on discute comme si on s'était vu la veille. Je sais qu'on sera toujours présente l'une pour l'autre. Et je te sou mets le même conseil qu'à Manel... afin qu'on puisse passer plus de temps ensemble, comme au bon vieux temps.

À ma Isa, présente depuis le début... Je suis tellement heureuse de t'avoir encore à mes côtés, depuis bientôt 20 ans. Je crois que tu es le liant de ce groupe d'amis. C'est d'autant plus vrai depuis que tu as tes deux petites merveilles qu'on adore admirer, en photos ou en vrai !

À la bolite et la brioche, au Sgeek à lunettes, à Jack Twist, vous me manquez. Nos retrouvailles, trop rares, sont toujours d'excellents moments.

Aux antillais :

Dani et Pau, merci d'avoir rendu notre mariage encore plus magique, vous avez assurés ! J'espère vous revoir très vite.

Flo mon fillot, Rom l'anesthésiste ET réanimateur, Tsytsy, Ambre, Marion et Jordan.

Aux copains d'externat et d'internat :

Ju et Marion, Lolo, Vincent, Jurko, Toinou, Cantoch, Toumtoum, Clairette, Mimi et Marion, Ben, Jeannot, Mathias, Joseph, Luch et « tout le pôle Pasteur » ! À Alex, pour nos sous-colles riches en rires et calories !

Aux varois :

Steve et Brigitte, Loic et Manon, Oliv, Jojo, Manu et Cécile.

À Julien et Aurélie, merci de m'avoir confié la lourde responsabilité d'être la marraine de votre adorable Valentin.

À mes Cunegonzs ! Mel, Harmonie, Chachou, Laura, Sarah, Sonia, Julie et Laeti, vous êtes folles mais je vous adore ! À nos nombreux restos, passés et à venir, qui me permettent de décompresser.

Aux merveilleuses rencontres du Master :

Audrey, ma super coloc. J'ai adoré notre trio de choc, qui a permis de faire paraître ce séjour marseillais presque trop court !

À Jo et Annabelle, travailler avec vous fut un véritable bonheur. J'ai tant appris et rigolé grâce à vous.

À l'équipe 3, Els, Elo, Emma, Camilla, Laura, Jozef, Rana et Mika.

Au bureau de l'Internat version 2013, Rémi, Pierre, Thibault et Pascale.

**À ma famille :**

À mes parents, papounet et mamounette. Je vous dois tout. Vous m'avez permis d'en être là aujourd'hui, en me soutenant et en m'aimant quotidiennement. Vous m'avez transmis vos valeurs de travail et d'intégrité et vous avez fait de moi une femme épanouie, bien dans ses pompes et fière de ce qu'elle est devenue grâce à vous. Maman, tu as conjugué vie professionnelle et familiale d'une main de maître, tout en nous couvant d'amour. Je tiens de toi ce côté déterminé, entier et droit qui te fait aller au charbon au nom de ton engagement. Papa, mon papa poule, tu nous as tellement gâtées et protégées. Tu m'as transmis ton côté cartésien, ton amour de la Science et de la découverte. Vous m'avez tout donné, toujours valorisée. J'espère vous rendre fiers. On ne peut rêver de meilleurs parents. Je vous aime

À ma sœur, même si je crois que les affrontements sont proportionnels à l'amour que l'on se porte, je suis heureuse de t'avoir retrouvée. Tu as été et tu resteras mon amie la plus intime, sur laquelle je peux compter, quelques soient les épreuves à traverser. Tu m'as permis d'avoir une enfance merveilleuse en m'ouvrant la voie tout en me protégeant constamment. Je serai toujours là pour toi. Merci à Yan de te rendre heureuse et de t'avoir donné vos 2 merveilles que j'aime plus que tout. Axel, peut-être un jour prendras-tu le même chemin, surtout si tu continues à jouer avec les « outils de tata ». Lou, ta frimousse me fait craquer, n'arrête jamais de faire des câlins. Je vous aime

À Corinne, vous êtes la belle-mère idéale, présente et prévenante, sans être envahissante. Vous avez su transmettre votre gentillesse et bien d'autres valeurs à vos enfants et surtout vous avez appris à JB à faire la cuisine... ;)

À Math et Mad,

À la famille Reverso, Bessone, Vo :

À ma mémé adorée, tant de moments passés dans ma deuxième maison. Tant d'amour donné. Merci pour tout.

À (ma tata) Cathie, tu ne peux rien dire, c'est ma thèse ! ;) Merci de m'avoir initiée au 7<sup>ème</sup> Art, notamment aux chefs d'œuvre tels qu'Indiana Jones et Star Wars, après lesquels je n'ai jamais fait de cauchemar grâce aux boudoirs et au verre de lait, même si certaines scènes étaient « positivement répugnantes » !

À mes cousins, Vincent et Soph, Mag et Serge et leur progéniture, Steph et Antoine. Serge, je ne sais pas si tu en es conscient mais si je suis là aujourd'hui, c'est en grande partie grâce à toi ! Je te remercie tous les jours pour m'avoir dit sur le campus de Valrose : « Fais médecine, t'auras un métier, et la recherche t'auras quand même l'occasion d'en faire ! » On peut dire que t'as vu sacrément juste !

À Jeanine, Marie, Louis, Philippe, Theresa et les « petits »

À la famille Gastaud :

À ma mamie, merci de nous permettre de tous nous retrouver autour de toi.

À mon parrain, Christian, une présence discrète mais rassurante.

À Brigitte et Nico, merci de m'avoir fait confiance en me désignant marraine d'Ornella, ma filleule adorée.

À mes oncles et tantes,

À mes cousins, Marc, Eléonore, Jenny, Mika, Hélène, Nico, Lolo, Alicia, Kevin, Manon, Lorenzo, Alexandre, John, Jimmy, Steeve, Gabriella.

À la famille Barbé :

Merci de m'avoir si chaleureusement accueillie dans votre famille.

À Yvette,

À Lio, Colette, Lolo, Steve, Lena, Nael,

À Lydie, Christian, Nana, Enzo, Nino,

À tous les Barbé du Bassin et de Bordeaux et même d'Antibes ;)

À la famille Scoffier :

À Ines et Flo,

À ceux partis beaucoup trop tôt et que j'aurais aimé avoir à mes côtés aujourd'hui, Dominique, Célia, papy, pépé, grand-mémé.

**À l'Homme de ma vie.**

Comment résumer en quelques lignes tout ce que tu représentes pour moi et tout ce que tu m'apportes ? Mon mari adoré, tu es un homme exceptionnel, courageux, attentionné, prévenant et adorable. Tu m'as permis de m'épanouir, seule et à deux. Nous sommes complémentaires, deux moitiés inséparables, tu blagues, je rigole, tu ranges, je dérange, tu cuisines, je mange... Merci d'être là, au quotidien, depuis bientôt 8 ans, de faire de notre foyer un endroit chaleureux où il fait bon vivre et où il y a toujours de quoi manger ! Merci de me faire rire, de me supporter et surtout de m'aimer... Je t'aime.

*Can we go back? This is the moment  
Tonight is the night, we'll fight till it's over  
So we put our hands up like the ceiling can't hold us  
Like the ceiling can't hold us*

*Macklemore*

*La vie est courte, l'art est long, l'occasion fugitive, l'expérience trompeuse, le jugement difficile.*

*Hippocrate*

**SOMMAIRE****LISTE DES PROFESSEURS AU 1<sup>ER</sup> SEPTEMBRE 2016 À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE NICE 4****REMERCIEMENTS 10****SOMMAIRE 22****LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 24****LISTE DES ANNEXES : 25****LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ANGLICISMES : 26****INTRODUCTION 29****A. LES LYMPHOMES B DIFFUS A GRANDES CELLULES (DLBCL) 29**

1. ÉPIDÉMIOLOGIE 29

2. BASES PHYSIOPATHOLOGIQUES ET MOLÉCULAIRES (BROUSSE N. ET BRUNEAU J.<sup>2</sup>) 303. ÉTIOLOGIE (SWERDLOW, S. H.<sup>13</sup>) 334. PRÉSENTATION CLINIQUE (SWERDLOW, S. H.<sup>13</sup>) 335. DIAGNOSTIC (SWERDLOW, S. H.<sup>13</sup>) 33

6. FACTEURS PRONOSTIQUES 36

7. PRISE EN CHARGE THÉRAPEUTIQUE 39

**B. RÔLE DE LA GAPDH DANS LE CONTEXTE DES LNH 46**

1. GAPDH ET GLYCOLYSE 46

2. STRUCTURE 48

3. FONCTIONS NON MÉTABOLIQUES DE LA GAPDH 48

4. RÉGULATION 51

5. RÔLE DE LA GAPDH DANS LES LNH 52

**OBJECTIFS 56****MATERIEL ET METHODE 57****A. COHORTE DE DERIVATION 57****B. COHORTE DE VALIDATION 57****C. ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE 58**

1. GÉNÉRALITÉS 58

2. INTERPRÉTATION ET QUANTIFICATION 58

3. PROCÉDÉ STANDARD DE COLORATION AUTOMATISÉE	59
4. INTERPRÉTATION DES IHC STANDARDS	60
5. MISE AU POINT DU MARQUAGE IMMUNO-HISTOCHEMIE GAPDH	60
6. INTERPRÉTATION DES MARQUAGES ANTI-GAPDH ET ANTI-CD20 ET ÉTABLISSEMENT D'UN SCORE	61
<b>D. ETUDE STATISTIQUE</b>	<b>62</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>63</b>
<b>A. L'EXPRESSION IHC DE LA GAPDH EST UN MARQUEUR PRÉDICTIF DE LA RÉPONSE AU R-CHOP</b>	<b>63</b>
1. EXPRESSION IHC DE LA GAPDH DANS LES DLBCL AU DIAGNOSTIC	63
2. LA GAPDH EST UN MARQUEUR PRÉDICTIF DE LA RÉPONSE AU R-CHOP	66
<b>B. QUEL MÉCANISME RELIE L'EXPRESSION DE LA GAPDH À LA RÉPONSE THÉRAPEUTIQUE AU R-CHOP :</b>	
<b>APPROCHE ANATOMOPATHOLOGIQUE</b>	<b>68</b>
1. LA GAPDH A UNE VALEUR PRÉDICTIVE INDÉPENDANTE DES AUTRES MARQUEURS PRONOSTIQUES IHC UTILISÉS EN CLINIQUE	68
2. CORRÉLATION ENTRE L'EXPRESSION PROTÉIQUE DE LA GAPDH ET DE CD20	70
<b>DISCUSSION</b>	<b>73</b>
<b>A. PRINCIPAUX RÉSULTATS</b>	<b>73</b>
<b>B. LIMITES</b>	<b>74</b>
<b>C. PERSPECTIVES</b>	<b>76</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>81</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>92</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>97</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	<b>100</b>
<b>SERMENT D'HIPPOCRATE</b>	<b>102</b>

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Aspect histologique d'un lymphome B diffus à grandes cellules. Coloration HES.....	34
Figure 2. Représentation schématique du champ d'action de l'anticorps monoclonal anti-CD20...	41
Figure 3. La glycolyse.....	47
Figure 4. Les différents rôles de la GAPDH.....	51
Figure 5. La surexpression de l'enzyme GAPDH est responsable d'un phénotype agressif dans un modèle de lymphome B murin.....	53
Figure 6 : Une expression élevée de l'ARNm de la GAPDH est associée à une bonne réponse thérapeutique pour les patients atteints de DLBCL traités au R-CHOP.....	55
Figure 7. Illustration de l'expression IHC de la GAPDH dans des biopsies ganglionnaires de patients atteints de DLBCL, prélevées au diagnostic.....	65
Figure 8. Répartition des DLBCL en fonction du score IHC GAPDH dans les deux cohortes.....	65
Figure 9. La GAPDH est un marqueur prédictif de la réponse au R-CHOP (Survie Globale).....	66
Figure 10. La GAPDH est un marqueur prédictif de la réponse au R-CHOP (Survie Sans Progression).....	67
Figure 11. L'expression IHC de la GAPDH corrèle à celle de CD20 dans les biopsies ganglionnaires des patients atteints de DLBCL.....	71
Table 1. Caractéristiques cliniques et démographiques des patients de la cohorte de dérivation (n=43) et de la cohorte de validation (n=294).....	64
Table 2 : Survies globale et sans progression en fonction des niveaux d'expression IHC de la GAPDH et de l'IPIaa en analyse multivariée.....	67
Table 3. Comparaison de l'expression de la GAPDH avec celle d'autres marqueurs pronostiques IHC dans la cohorte de dérivation.....	68
Table 4. Survie globale en fonction de l'expression de la GAPDH et des autres marqueurs pronostiques en analyse univariée et multivariée dans la cohorte de dérivation.....	69
Table 5. Survie globale en fonction de l'expression de la GAPDH et de CD20 en analyse univariée et multivariée dans la cohorte de dérivation.....	72

**LISTE DES ANNEXES :**

Annexe 1 : ARTICLE ORIGINAL EN COURS DE RÉVISION À NATURE MEDICINE.....	93
Annexe 2 : FICHE DE NON-OPPOSITION DES PATIENTS.....	94
Annexe 3 : INDEX PRONOSTIQUE DES DLBCL.....	96
Annexe 4 : CLASSIFICATION ANN ARBOR.....	97
Annexe 5 : ECOG PERFORMANCE STATUS / INDEX OMS.....	97

**LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ANGLICISMES :**

<sup>18</sup>F-FDG : [<sup>18</sup>F]-Fluorodéoxyglucose

ABC-DLBCL : Activated-B-Cell Diffuse Large B Cell Lymphoma

ACVBP : Adriamycine, Cyclophosphamide, Vindésine, Bléomycine, Prednisone

ADN : Acide désoxyriboNucléique

AIF : apoptosis-inducing factor

APE1 : Apurinic/aprimidinic endonuclease 1

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ATM : Ataxia Telangiectasia mutated

ATP : adénosine triphosphate

BCL-2 : B Cell CLL/Lymphoma 2

BCL-6 : B Cell CLL/Lymphoma 6

BCR : B cell receptor

BEAM ou BeEAM : Carmustine, etoposide, cytarabine, melphalan / Bendamustine, etoposide, cytarabine, melphalan

BLIMP-1 : B lymphocyte-induced maturation protein-1

BTK : Bruton's Tyrosine Kinase

Bulky disease : forte masse tumorale

CD : Cluster de differentiation

CHOP : Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicine, Oncovin, Prednisone

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CI : Intervalle de Confiance

CICD : caspase-independent cell death

C-MYC : Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog

COO : Cell of Origin

CRM-1 : chromosome region maintenance-1

Cut-off : seuil

DAB : diaminobenzidine

DGH : DLBCL GAPDH-High

DGL : DLBCL GAPDH-Low

DHAP : dexamethasone, cytarabine haute dose, cisplatine

DLBCL : Diffuse Large B Cell Lymphoma

EBV : Epstein-Barr Virus

ECOG PS : Eastern Cooperative Oncology Group Performans Status

EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2

FISH : Fluorescence in situ hybridization

FOXP1 : Forkhead box protein P1

G3P : Glycéraldéhyde-3-Phosphate

GABAa : Récepteur GABA (acide gamma-amniobutyrique) de type A

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase

GCB-DLBCL : Germinal center B-cell like diffuse large B-cell lymphoma

GTPase : Enzyme hydrolysant la Guanosine Triphosphate

H<sup>+</sup> : proton / ion correspondant à un isotope de l'Hydrogène

HGBL : High grade B cell lymphoma

HIF1 : Hypoxia-Inducible Factor 1

Hit : "cassure chromosomique" : double-hit : double cassure chromosomique

HR : Hazard Ratio

HRP : *horseradish peroxidase*

HSP70 : Heat shock protein de 70 kDa

H-score : Histo-score : immune-score

Ig : Immunoglobuline

IGH : chaine lourde des immunoglobulines

IHC : immunohistochimie/immunohistochimique

INCA : Institut National du Cancer

IPI / IPIaa : Index Pronostic International / Index Pronostic International ajusté à l'âge

kDa : KiloDalton

Ki-67 / MIB1 : Antigène Ki-67 (Abréviation de Kiel) : marqueur de prolifération cellulaire / MIB1 : Methylation-inhibited binding prontein 1 : anticorps anti-Ki67

LDH : Lactate Deshydrogenase

LMO2 : LIM domain only 2

LNH : Lymphome Non Hodgkinien

LYSA / LYSARC : The Lymphoma Study Association / The Lymphoma Academic Research Organisation

m-TOR : mammalian target of rapamycin

MUM-1 : Multiple myeloma oncogene 1

MYD 88 : Myeloid differentiation primary response gene 88  
 NAD/NADH : formes oxydée et réduite du nicotinamide adénine dinucléotide  
 NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
 NGS : Next Generation Sequencing  
 NO : monoxyde d'azote endogène  
 NOS : not otherwise specified  
 OCA-S : Oct-1 Co-Activator in S-phase  
 OS : overall survival = survie globale  
 OxPhos : phosphorylation oxydative  
*P* : p value  
 P53 : Protéine de 53 kDa / *TP53* : tumor protein 53  
 PEPC : Prednisone, etoposide, procarbazine, cyclophosphamide  
 PFS : progression free survival = survie sans progression  
 Phase S : phase de synthèse de l'ADN  
 Pi : phosphate inorganique  
 P-I $\kappa$ B $\alpha$  : nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer in B cells inhibitor, alpha, phosphorylated  
 R : rituximab  
 RHEB : Ras homolog enriched in brain  
 RLRR : lignée de lymphome folliculaire humain rendue résistante au Rituximab  
 RLRS : lignée de lymphome folliculaire humain sensible au Rituximab  
 RT-MLPA : Reverse Transcriptase–Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification  
 SIAH1 : seven in absentia homolog 1  
 SUV max : Standard uptake value  
 TEP-Scanner : Tomographie par Émission de Positons-scanner  
 TMA : tissue microarray  
*TNF $\alpha$*  : *tumor necrosis factor alpha*  
 TRAF2 : TNF receptor-associated factor 2  
 Unclassified-DLBCL : inclassable  
*Vegf $\alpha$*  : vascular endothelial growth factor alpha  
 VHL : Von Hippel-Lidau  
 VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine  
 WHO : World Health Organisation

## INTRODUCTION

### A. LES LYMPHOMES B DIFFUS A GRANDES CELLULES (DLBCL)

#### 1. Épidémiologie

Les lymphomes sont, en termes d'incidence, le 6<sup>ème</sup> cancer mondial, soit environ 70 000 nouveaux cas par an en Europe et 80 000 aux États-Unis. Ils représentent plus de 3% des cancers dans le monde avec une prévalence évaluée à 2 millions de patients en cours de traitement ou en rémission. La mortalité est élevée, touchant environ 140 000 personnes par an (données LYSARC<sup>1</sup>).

Les lymphomes sont classés en lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens (LNH). Ces deux grandes entités sont hétérogènes à la fois d'un point de vue moléculaire, mais aussi morphologique, clinique et pronostique et comportent une multitude de sous-types histologiques (Brousse N. et Bruneau J.<sup>2</sup>). En France en 2011, les LNH se situent au 5<sup>ème</sup> rang des cancers les plus fréquents avec plus de 11600 nouveaux cas (données INCA<sup>3</sup>).

Les proliférations lymphocytaires B, appelées lymphomes non hodgkiniens de type B (LNH B) représentent 85-90 % des lymphomes non hodgkiniens.

Le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) est le LNH le plus fréquent, représentant environ 40% de l'ensemble des lymphomes et près de 80% des lymphomes agressifs.

Il survient à tout âge avec une médiane aux alentours de 50 à 60 ans. La présentation clinique peut être ganglionnaire dans 60% des cas ou exclusivement extra-ganglionnaire (initialement) dans 40% des cas. La croissance tumorale est rapide et l'index de prolifération élevé. Ils peuvent survenir *de novo* ou être secondaires à un lymphome B à petites cellules (de bas grade).

## 2. Bases physiopathologiques et moléculaires (Brousse N. et Bruneau J.<sup>2</sup>)

### a. Oncogènes

Les lymphomes sont des hémopathies malignes liées à la prolifération de cellules lymphoïdes. À chacun des stades de leur développement, les lymphocytes sont exposés à un risque de transformation oncogénique pouvant conduire à un lymphome.

Tous les phénomènes qui contribuent à augmenter la prolifération lymphocytaire de manière durable ou qui interfèrent avec les processus de réparation de l'ADN entraînent un risque accru d'événements oncogéniques. Le processus de transformation oncogénique implique de multiples événements génétiques. Des translocations chromosomiques récurrentes sont retrouvées dans la plupart des lymphomes.

Dans les lymphomes B, ces translocations impliquent le plus souvent un réarrangement entre le locus des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGH) en 14q32 et un oncogène dont l'expression se trouve ainsi augmentée. Des amplifications géniques ou des mutations d'autres oncogènes peuvent également survenir.

Les principaux oncogènes dérégulés au cours des DLBCL sont :

- le gène suppresseur de tumeur *BCL-6* (30% des DLBCL). *BCL-6* est un répresseur transcriptionnel exprimé dans les lymphocytes B au cours de l'activation du centre germinatif. Il réprime l'expression de gènes de différenciation (notamment *BLIMP-1* permettant la différenciation terminale en plasmocytes) et de gènes de réparation de l'ADN (*P53*, *ATM*) et induit la prolifération cellulaire. Ainsi, pendant la réaction du centre germinatif, l'action de *BCL-6* favorise l'apparition de lésions de l'ADN et la survenue de translocations aberrantes.
- le gène *BCL2* codant pour une protéine anti-apoptotique (20% des cas).
- l'oncogène *C-MYC* (5 à 15 % des DLBCL) qui est un facteur transcriptionnel de plusieurs protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire.

La dérégulation de ces oncogènes entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation contrôlant la prolifération cellulaire et le contrôle de l'apoptose, participant ainsi à la transformation lymphomateuse.

#### b. Variants moléculaires

Depuis le début des années 2000 trois variants moléculaires ont été caractérisés par analyses transcriptomiques : les GCB-DLBCL (germinal center B-like DLBCL), constitués de cellules issues du centre germinatif et les ABC-DLBCL (Activated-B-Cell DLBCL) constitués de cellules exprimant les mêmes gènes que ceux retrouvés lors de l'activation des lymphocytes B activés. Initialement, un troisième groupe nommé 'Unclassified'-DLBCL avait été défini et s'est révélé être constitué de cas ne pouvant être classé en GCB-DLBCL ou ABC-DLBCL sans former un réel groupe distinct (Alizadeh, A. A.<sup>4</sup>, Wright, G.<sup>5</sup>). La classification moléculaire des DLBCL (COO classification : Cell of Origin) est très pertinente d'un point de vue pronostique puisqu'elle a permis de montrer que les GCB-DLBCL sont associés à une meilleure survie que les ABC-DLBC (Alizadeh, A. A.<sup>4</sup>, Lenz, G.<sup>6</sup>). Cependant, le délai et les moyens requis pour l'analyse du profil d'expression génique sont actuellement incompatibles avec la prise en charge thérapeutique des patients. Basée sur la caractérisation moléculaire, le profil d'expression immunohistochimique des protéines CD10, BCL-6 et MUM1 a permis de classer les DLBCL en deux sous-groupes (algorithme de Hans) : les GCB-DLBCL et les non-GCB-DLBCL (regroupant les ABC-DLBCL et les 'Unclassified'-DLBCL) (Hans, C. P.<sup>7</sup>). Bien qu'elle soit toujours recommandée dans la dernière classification OMS 2016 des néoplasies lymphoïdes (Swerdlow, S. H.<sup>8</sup>), car réalisable en pratique courante, cet algorithme IHC ne corrèle pas parfaitement avec la classification moléculaire (Hans, C. P.<sup>7</sup>, Gutiérrez-García, G.<sup>9</sup>).

Des études ont identifié d'autres groupes de DLBCL ayant une expression génique différente (Monti, S.<sup>10</sup>) : les B Cell Receptor (BCR-DLBCL) présentant une surexpression des gènes impliqués dans la signalisation par le BCR et les OxPhos-DLBCL, enrichis en gènes impliqués dans la phosphorylation

oxydative mitochondriale. Ces signatures moléculaires semblent en rapport avec le statut métabolique des DLBCL (Caro, P.<sup>11</sup>). Ainsi, les OxPhos-DLBCL utilisent préférentiellement la respiration mitochondriale pour générer leur énergie alors que les BCR-DLBCL présentent un flux glycolytique augmenté.

Les DLBCL diffèrent également par la signature génique de leur microenvironnement tumoral (Lenz, G.<sup>6</sup>, Scott, D. W.<sup>12</sup>). Le groupe “stromal-1”, codant pour des gènes de composants de la matrice extracellulaire a un meilleur pronostic que le groupe “stromal-2” codant pour des gènes liés à l’angiogénèse.

Des études récentes de séquençage à haut débit (Next Generation Sequencing) (Swerdlow, S. H.<sup>8</sup>) ont identifié des mutations somatiques communes à tous les sous-types de DLBCL comme la mutation inactivatrice de *TP53* et de gènes intervenant dans l’immunosurveillance, des altérations de régulateurs épigénétiques ou l’activation oncogénétique de *BCL-6*.

Il existe par ailleurs des altérations génétiques spécifiques à chaque sous-groupe.

Les GCB-DLBCL présentent notamment des remaniements des gènes des histone méthyl transférases comme *EZH2* et des translocations de *BCL-2*.

Plusieurs mutations somatiques ont été décrites au niveau des différentes molécules participant à la signalisation par le récepteur des cellules B (BCR). C’est par exemple le cas de la mutation *MYD88 L265P*, observée dans 29% des ABC-DLBCL. Ces évènements convergent vers l’activation de la voie NF-kB. Le facteur de transcription NF-kB est impliqué dans l’activation, la prolifération et la survie lymphocytaire.

Les implications cliniques de ces mutations ne sont pas encore totalement comprises mais les attentes sont importantes notamment pour guider la prise en charge thérapeutique. Il n’existe pas à l’heure actuelle de protocole thérapeutique validé basé sur les études de transcriptome, sur les sous-groupes

immunohistochimiques ou sur les mutations somatiques observées au sein des DLBCL (Swerdlow, S. H.<sup>8</sup>) mais des essais thérapeutiques sont actuellement ouverts.

### 3. Étiologie (Swerdlow, S. H.<sup>13</sup>)

L'étiologie des DLBCL reste inconnue à l'heure actuelle. Ils surviennent la plupart du temps *de novo* (dits lymphomes primaires), mais peuvent se présenter sous la forme d'une progression ou transformation d'un lymphome moins agressifs (dits lymphomes secondaires).

L'immunodéficience est un facteur de risque significatif et dans ce cas les DLBCL sont plus souvent liés à l'Epstein-Barr Virus (EBV). Le taux d'infection à EBV au sein des DLBCL non immunodéficients est d'approximativement 10 %.

### 4. Présentation clinique (Swerdlow, S. H.<sup>13</sup>)

Les patients atteints de DLBCL présentent une masse tumorale à croissance rapide touchant un ou plusieurs sites ganglionnaires ou extra-ganglionnaires. Presque la moitié des patients présentent un stade localisé de leur maladie au diagnostic. La plupart des patients est asymptomatique. Les symptômes dépendent du site atteint.

Les tableaux cliniques principaux devant faire évoquer un DLBCL sont la présence d'une ou plusieurs adénopathies périphériques, une fièvre au long cours et un prurit inexplicables.

Des tableaux d'urgence peuvent être révélateurs comme un syndrome cave supérieur, une masse abdominale ou un syndrome neurologique sur compression médullaire.

### 5. Diagnostic (Swerdlow, S. H.<sup>13</sup>)

Le diagnostic est porté sur l'examen anatomopathologique d'une biopsie ou d'une exérèse chirurgicale d'un ganglion ou d'un site suspect réalisées sous contrôle radiologique ou au bloc opératoire.

### a. Morphologie

L'étude anatomopathologique du ganglion montre une prolifération diffuse de cellules lymphoïdes de grande taille ayant totalement ou partiellement détruit l'architecture ganglionnaire et envahissant souvent les tissus adjacents (Figure 1). L'infiltration partielle peut être inter-folliculaire ou sinusale. La prolifération peut être parcourue de bandes fibreuses plus ou moins larges réalisant un vague aspect de nodulation.

Cytologiquement, il s'agit de grandes cellules dont le noyau atteint ou excède la taille d'un noyau de macrophage ou deux fois celle d'un lymphocyte normal.

Il existe plusieurs variants morphologiques pouvant présenter un fond riche en lymphocytes T et/ou en histiocytes. Ces derniers ne doivent pas être confondus avec des lymphomes B riches en lymphocytes T/histiocytes.

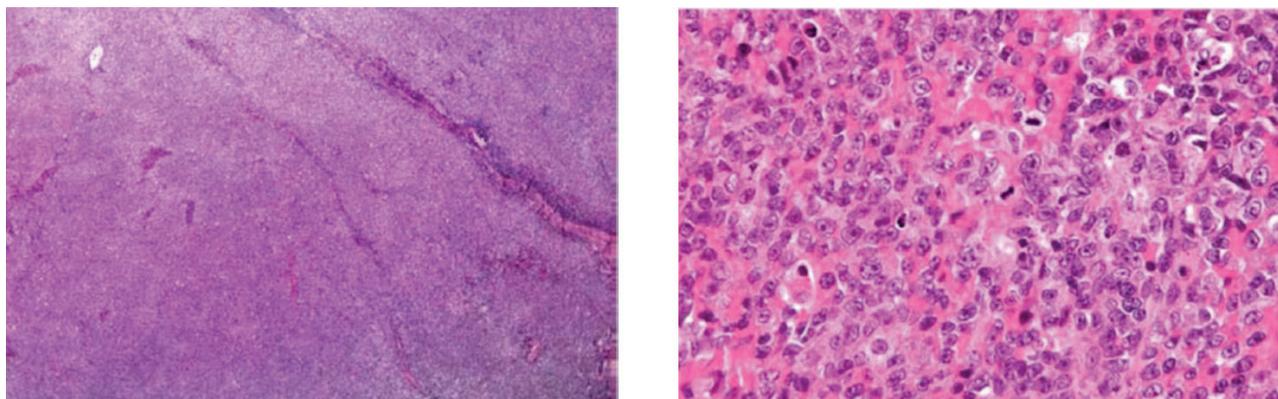


Figure 1. Aspect histologique d'un lymphome B diffus à grandes cellules. Coloration HES.

À gauche, au faible grossissement : prolifération diffuse avec destruction de l'architecture ganglionnaire. À droite, au fort grossissement : cellules lymphoïdes de grande taille nucléolées, index mitotique élevé.

#### i. Variant centroblastique

Il s'agit du variant le plus commun. Les centroblastes sont des cellules lymphoïdes de taille moyenne à grande au noyau vésiculaire rond ou ovalaire contenant une chromatine fine. On observe 2 à 4 nucléoles accrochés à la membrane nucléaire. Le cytoplasme peu abondant est amphophile à

basophile. Dans certains cas, la tumeur est monomorphe, entièrement constituée de centroblastes (> 90 %). Le plus souvent, elle est polymorphe sous la forme d'une association de centroblastes et d'immunoblastes. Dans de rares cas, notamment dans les présentations osseuses ou extra-ganglionnaires, les cellules tumorales peuvent présenter un noyau multilobulé.

#### ii. Variant immunoblastique

Dans ce variant, plus de 90 % des cellules tumorales sont des immunoblastes, présentant un unique volumineux nucléole central et un cytoplasme relativement abondant basophile.

#### iii. Variant anaplasique

Ce variant est caractérisé par des grandes ou très grandes cellules rondes, ovalaires ou polygonales présentant un pléomorphisme nucléaire important pouvant ressembler à des cellules de Hodgkin, de Reed-Sternberg ou à des cellules tumorales de lymphome anaplasique à grandes cellules. Les cellules tumorales peuvent s'agencer en massifs cohésifs ou infiltrer les sinus ganglionnaires mimant alors un carcinome indifférencié.

#### b. Immunophénotype

Les cellules tumorales expriment les marqueurs immunohistochimiques (IHC) Pan-B tels que CD19, CD20, CD22 et CD79a bien que l'un ou plusieurs d'entre eux puissent manquer. Les marqueurs plasmocytaires tels CD38 et CD138 sont rarement co-exprimés dans les cellules CD20 positives. Les cellules tumorales peuvent exprimer le CD30, surtout dans le variant anaplasique.

Les cas exprimant le CD5 représentent 5 % des DLBCL ; il s'agit pour la plupart de DLBCL de novo et très rarement de l'évolution d'une leucémie lymphoïde chronique ou d'un lymphome lymphocytaire.

L'expression de CD10, BCL-6 et MUM-1 varie. Le CD10 est observé dans 30-60 %, BCL-6 dans 60-90 % et MUM-1 dans 35-65 % des cas. Contrairement aux lymphocytes normaux du centre germinatifs pour lesquels BCL-6 et MUM-1 sont mutuellement exclusifs, la co-expression de ces deux marqueurs est retrouvée dans 50 % des cas de DLBCL (Falini, B.<sup>14</sup>).

Une expression forte et uniforme de FOXP1 a été reportée dans des DLBCL de type non-GC exprimant MUM-1 et BCL-2 en l'absence de translocation t(14 ;18) (Barrans S.<sup>15</sup>).

L'index de prolifération, évalué par détection du Ki-67 par l'anticorps MIB1 est élevé et peut même être supérieur à 90 %.

P53 est exprimée dans 20 à 60 % des cas.

## 6. Facteurs pronostiques

### a. Cliniques

L'Index Pronostic International (IPI), déterminé à partir de cinq paramètres (l'âge du patient, le nombre de sites extra-ganglionnaires atteints, l'état général du patient, le stade Ann-Arbor (cf Annexes) et le niveau de la lactate déshydrogénase (LDH) sérique) est un facteur pronostique de la survie globale des patients à 4 ans. Les trois dernières variables (état général, stade et taux de LDH) sont prises en compte dans l'établissement de l'IPI ajusté à l'âge (IPIaa), un score simplifié permettant de stratifier les patients dans des groupes pronostiques différents selon qu'ils soient âgés de plus ou moins de 60 ans (International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project.<sup>16</sup>). De ce fait il est utilisé en routine par les onco-hématologues pour déterminer la prise en charge thérapeutique du patient (nombre de cycles de traitement à effectuer et type de chimiothérapie à administrer en combinaison avec l'immunothérapie). En revanche, il ne prend pas en compte les caractéristiques moléculaires très hétérogènes des DLBCL.

La pertinence de cet index a été validée à l'ère du Rituximab et il reste applicable actuellement (Ziepert, M.<sup>17</sup>). Il apparaît cependant que les patients porteurs d'un même score IPI peuvent avoir des réponses au traitement différentes (Coiffier, B.<sup>18</sup>).

L'infiltration de la moelle osseuse au diagnostic est un facteur de mauvais pronostic indépendant de l'IPI avec 10 % de survie à 5 ans.

## b. Paracliniques

### i. Imagerie

Les valeurs SUVmax (intensité de la fixation de l'analogue non-métabolisable du glucose  $^{18}\text{F}$ -FDG dans les tumeurs) collectées par TEP-Scanner avant et après deux et/ou quatre cycles de traitements ainsi qu'à la fin du traitement, quantifient l'activité métabolique des tumeurs et permettent d'évaluer le volume tumoral. Elles permettent d'identifier à posteriori les patients réfractaires au traitement. Le plus souvent, ces patients présentent un SUVmax intense et une masse tumorale importante (Casasnovas, R.-O.<sup>19</sup>). Néanmoins, de nombreux paramètres dépendants et indépendants des patients peuvent faire varier les valeurs de SUVmax, ainsi, il n'est pas rare d'observer une masse tumorale importante en dépit d'une faible fixation du  $^{18}\text{F}$ -FDG (Xie, M.<sup>20</sup>, Boellaard, R.<sup>21</sup>).

### ii. Cytogénétique

Quelle que soit l'option thérapeutique mise en œuvre, la translocation de *C-MYC* dans les DLBCL (détectée par FISH) corrèle avec un mauvais pronostic (Horn, H.<sup>22</sup>, Thieblemont, C.<sup>23</sup>).

Certains DLBCL peuvent présenter une translocation de *C-MYC* combinée à un réarrangement de *BCL2* (double hits, classés GCB-DLBCL par IHC) ou *BCL6* (double hits), voire de *BCL2* et *BCL6* (triple hits), qui assombrissent un peu plus le pronostic vital du patient (Horn, H.<sup>22</sup>). Ces DLBCL sont appelés Lymphomes B de Haut grade dans la nouvelle classification (HGBL) avec réarrangement de *MYC* et *BCL-2* et/ou *BCL-6*.

Cependant, ces lymphomes sont très rares (moins de 10%) et ne représentent qu'un pourcentage faible des patients présentant un DLBCL insensible au R-CHOP. Les réarrangements isolés de *BCL2* et *BCL6* ne sont pas des facteurs de risque indépendants (Horn, H.<sup>22</sup>). Il a également été démontré que la translocation de *MYC* n'a de valeur pronostique qu'en cas de réarrangement avec un gène des immunoglobulines (Copie-Bergman, C.<sup>24</sup>).

## iii. Immunohistochimie

La surexpression de *MYC* (seuil à 40 %) est détectée dans près de 30 à 50 % des DLBCL et est associée à une co-expression de *BCL-2* (seuil à 50 %) dans 20 à 35 % des cas (« double-expressers ») (Johnson, NA.<sup>25</sup>, Karube K.<sup>26</sup>). La plupart de ces cas ne présentent pas d'altérations chromosomiques ni de *MYC*. Ils auraient un pronostic défavorable mais sont moins agressifs que les HGCL double ou triple hits.

La surexpression isolée de *BCL-2* était associée à un mauvais pronostic avant l'ère du Rituximab, notamment dans les ABC-DLBCL. Elle garde une valeur pronostique chez les personnes âgées (Petrella, T.<sup>27</sup>) ou si elle est associée à une surexpression de *MYC* chez les patients jeunes. Son expression n'est pas nécessairement corrélée à la présence d'une translocation de *BCL2* (t(14 ;18)) (Hermine, O.<sup>28</sup>, Hill, M. E.<sup>29</sup>, Gascoyne, R. D.<sup>30</sup>).

La surexpression de *BCL-6* serait associée à un bon pronostic (Horn, H.<sup>22</sup>). Il n'existe pas toujours de corrélation entre les niveaux d'expression génique et l'expression protéique (Lossos, I. S.<sup>31</sup>, Allman, D.<sup>32</sup>). L'adjonction du Rituximab semble avoir éliminé son impact pronostique.

Récemment, il a été démontré que l'expression IHC d'HIF-1a (Hypoxia-Inducible Factor 1a) était associée à un bon pronostic pour les patients atteints de DLBCL et traités au R-CHOP (Evens A. M.<sup>33</sup>). Cependant, la courte demi-vie de HIF-1a (10 min), rend discutable sa détection IHC et peut expliquer l'hétérogénéité des résultats, à l'origine de conclusions contradictoires à ce sujet (Evens, A. M.<sup>34</sup>, Bhalla, S.<sup>35</sup>).

Si la mutation de *TP53* est connue comme facteur de mauvais pronostic, le marquage IHC de P53 a fait l'objet d'études contradictoires (Ichikawa, A.<sup>36</sup>, Kramer, M. H.<sup>37</sup>, Koduru, P. R. K.<sup>38</sup>).

Le CD5 est un marqueur de surface des lymphocytes T qui peut être observé dans 10% des DLBCL. Sa positivité est corrélée à un mauvais pronostic et à un profil d'expression génique différent des GCB/ABC-DLBCL.

L'algorithme de Hans (cf chapitre A.2.b) classant les DLBCL en type GC et non-GC ne permet pas de prédire de manière fiable le pronostic (Copie-Bergman, C.<sup>39</sup>, Nyman, H.<sup>40</sup>).

#### iv. Biologie Moléculaire

Avant l'ère du Rituximab, la plupart des études ont montré que la classification « moléculaire » COO avait une valeur pronostique. Un DLBCL de type ABC serait de plus mauvais pronostic qu'un GCB-DLBCL. Chez les patients traités par immuno-chimiothérapie, cette signification clinique est plus controversée. Bien que la publication princeps de Lenz<sup>6</sup> ait montré que la COO moléculaire avait une grande valeur prédictive quel que soit le traitement reçu, d'autres études n'ont pas retrouvé de différence significative en termes de survie entre les ABC-DLBCL et les GCB-DLBCL (Staiger, AM.<sup>41</sup>). Cependant, dans le cadre des DLBCL réfractaires, Thieblemont et al ont montré que les GCB-DLBCL réfractaires ou en rechute avaient un meilleur pronostic que les ABC-DLBCL, notamment s'ils étaient traités par R-DHAP (Rituximab, dexaméthasone, cytarabine haute dose, cisplatine) (Thieblemont, C.<sup>23</sup>).

D'autres « sous-groupes » ont été identifiés sur le plan moléculaire. Certains ayant une signature génique de type « phosphorylation oxydative », d'autres de type « BCR/prolifération » ou encore de type « réponse de l'hôte » (Monti, S.<sup>10</sup>). Ces sous-groupes n'ont pas de valeur pronostique mais pourraient suggérer de potentielles cibles thérapeutiques.

#### 7. Prise en charge thérapeutique

Chaque fois que possible, les patients doivent être traités dans le cadre d'essais cliniques. Actuellement (mars 2017) on dénombre près de 259 études ouvertes. Chaque cas est discuté en réunion de concertation multidisciplinaire afin de décider de la meilleure stratégie thérapeutique à proposer au patient.

### a. Molécules de base

A l'heure actuelle, le traitement de référence est une combinaison d'immunothérapie et de polychimiothérapie à base d'anthracyclines.

#### i. Rituximab

Le Rituximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre la molécule CD20 exprimée à la surface des lymphocytes B du stade pré-B au stade B activé (Figure 2). Cette molécule est considérée comme standard thérapeutique depuis 2001-2002 (Coiffier, B.<sup>42</sup>). Par un mécanisme dépendant du complément, le Rituximab conduit à la mort des lymphocytes B qui expriment CD20 (Boross, P.<sup>43</sup>). Son efficacité est en partie liée aux nombres de cellules B exprimant CD20 et à l'abondance de CD20 exprimé à leur surface (Johnson, N. A.<sup>44</sup>). Une diminution de l'expression de CD20 explique en partie la résistance des DLBCL au R-CHOP (Tsai, P.-C.<sup>45</sup>).

De nouveaux anticorps monoclonaux anti-CD20 sont en cours de développement notamment l'Obinutizumab (GA-101) qui présente in vitro une meilleure affinité pour les cellules effectrices et un mécanisme de mort cellulaire directe différent et plus efficace que celui du Rituximab. L'utilisation de l'Obinutizumab à la place du Rituximab pourrait permettre une meilleure réponse et fait actuellement l'objet d'un essai du LYSA (GAINED trial<sup>46</sup>).

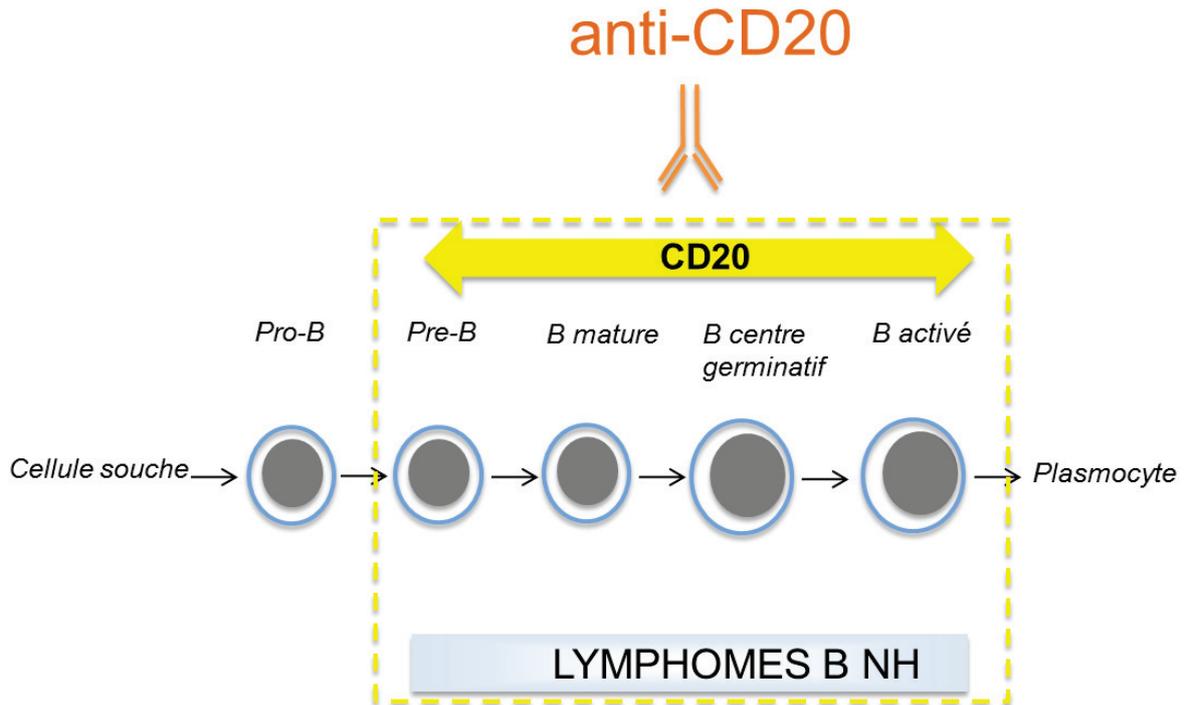


Figure 2. Représentation schématique du champ d'action de l'anticorps monoclonal anti-CD20.

Le CD20 est un marqueur spécifique des cellules B au cours de leur développement du stade pré-B au stade de lymphocyte B mature. Le Rituximab est un anticorps monoclonal ciblant la molécule CD20. Son mécanisme d'action met en jeu l'activation du complément et la cytotoxicité à médiation cellulaire.

## ii. Chimiothérapie

Le cocktail de chimiothérapie standard est appelé CHOP, l'acronyme pour Cyclophosphamide, (Hydroxy)daunorubicine, Vincristine (Oncovin), Prednisone.

Dans les formes de mauvais pronostic, l'alternative consiste à administrer de l'ACVBP, l'acronyme pour Adriamycine, Cyclophosphamide, Vindésine, Bléomycine, Prednisone.

### b. Approche thérapeutique conventionnelle selon le stade

Le choix des molécules et de la séquence d'administration se base sur les caractéristiques « cliniques » des patients, comportant plusieurs facteurs tels que l'âge, le stade, la masse tumorale (« Bulky disease ») et l'IPI. En 2015, la Société Française d'Hématologie a rédigé un référentiel de recommandations en fonction de ces critères.

i. 1<sup>ère</sup> ligne**Stades localisés (Ann Arbor I-II)**

- DLBCL Non Bulky (< 7 cm) :

Pour les patients IPI = 0 : 4 cycles de R-CHOP 21

Pour les patients IPI > ou = 1 : 6 cycles de R-CHOP 21

Radiothérapie facultative si TEP de fin de traitement négative.

- DLBCL Bulky (> 7 cm) :

6 cycles de R-CHOP 21 + Radiothérapie (30-36 Gy) ou

8 cycles de R-CHOP 21 ou

R-ACVBP + Consolidation séquentielle

**Stades étendus (Ann Arbor III-IV)**

- Sujets jeunes (< 60 ans) :

Pour les patients IPI<sub>aa</sub> = 1 : 6 à 8 cycles de R-CHOP 14 ou 21 ou R-ACVBP + consolidation séquentielle pour les phénotypes non-GCB selon Hans

Pour les patients IPI<sub>aa</sub> = 2 ou 3 : 8 cycles de R-CHOP 14 ou 21 ou R-ACVBP + consolidation séquentielle ou R-CHOP (ou R-ACVBP) + autogreffe (conditionnée par BEAM ou BeEAM)

- Sujets âgés (> ou = 60 ans) :

Patients en bon état général entre 60 et 80 ans : 8 cycles de R-CHOP 21 ou 6 cycles de R-CHOP 14 + 2R

Patients en bon état général > 80 ans : 8 cycles de R-miniCHOP (avec préphase)

Patients fragiles : R-COP ou Chimiothérapie orale (PEPC ou autre) ou R-Bendamustine ou Soins palliatifs

### **Prophylaxie neuro-méningée**

Tous les patients doivent bénéficier d'une ponction lombaire exploratrice et d'une injection prophylactique intra-thécale de méthotrexate lors de la 1<sup>ère</sup> cure de chimiothérapie. Une prophylaxie supplémentaire est recommandée pour les patients à haut risque de rechute neuro-méningée.

### **Cas particuliers**

Plusieurs critères font entrer les patients dans le cadre de cas particuliers pour lesquels une adaptation thérapeutique est nécessaire. Il s'agit de patients présentant une dysfonction cardiaque, une atteinte neuro-méningée, une atteinte testiculaire, un lymphome de bas grade concomitant, un statut VIH positif, un DLBCL intermédiaire DLBCL/Burkitt, double/triple hits ou un DLBCL de type lymphome B primitif du médiastin.

#### ii. Rechutes / progression

Rattrapage par chimiothérapie à base de sel de platine puis consolidation par autogreffe pour les patients chimio-sensibles et éligibles à l'autogreffe.

#### iii. Évaluation de l'efficacité et surveillance

Bilan clinique, biologique et radiologique à mi-traitement, en fin de traitement et en surveillance.

#### c. Approche thérapeutique selon la COO

Une autre approche consiste à prendre en compte le variant moléculaire pour cibler les DLBCL de mauvais pronostic. La survie sans progression à 5 ans des ABC-DLBCL est de 40 % contre 74% pour les GCB-DLBCL traités par R-CHOP. Compte tenu de ce pronostic défavorable, les essais cliniques concernent essentiellement les ABC-DLBCL en se basant sur leur biologie moléculaire.

La voie NF-kB est impliquée dans la tumorigénèse des ABC-DLBCL. L'activation de NF-kB par la libération de sa protéine inhibitrice (P-IkBa) déclenche la transcription de gènes anti-apoptotiques.

Des essais thérapeutiques sont en cours, notamment un essai associant la chimiothérapie conventionnelle au Bortezomib (essai NCT01324596), un inhibiteur du protéasome, qui diminue la dégradation de P-IkBa et donc l'activité de la voie NF-kB.

Le Lenalidomide est un immunomodulateur inhibant l'activité de NF-kB *in vitro*. Une étude rétrospective concernant des DLBCL réfractaires ou en rechute a montré que la survie était significativement augmentée chez les ABC-DLBCL comparée aux GCB-DLBCL après l'administration en monothérapie de ce traitement (Hernandez-Ilizaliturri FJ.<sup>47</sup>). Des études en première ligne n'ont pas montré de différence significative en termes de survie entre les ABC et les GCB-DLBCL. D'autres essais sont actuellement en cours (Clinical trial<sup>48</sup>).

L'Ibrutinib est un inhibiteur de la Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) ciblant l'activation constitutive du BCR qui entraîne l'activation de la voie NF-kB. Les premiers essais ont montré une bonne tolérance (Younes A.<sup>49</sup>, Wilson WH.<sup>50</sup>) et d'autres essais en étudiant l'efficacité sont en cours (Clinical trial<sup>51</sup>).

*Les DLBCL sont les lymphomes B non hodgkiniens les plus fréquents. Il s'agit de lymphomes agressifs, hétérogènes sur le plan clinique, moléculaire, métabolique et au pronostic variable. Des facteurs pronostiques, notamment l'IPI, permettent d'identifier au diagnostic les lymphomes les plus agressifs mais il semble que des patients présentant le même IPI répondent différemment au traitement actuel. Depuis l'apport de l'immunothérapie au début des années 2000 qui a largement amélioré la survie des patients, l'arsenal thérapeutique n'a pas été incrémenté et 30 à 40 % des DLBCL restent en échec thérapeutique.*

## B. ROLE DE LA GAPDH DANS LE CONTEXTE DES LNH

### 1. GAPDH et glycolyse

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ou GAPDH est une enzyme de la glycolyse de type oxydoréductase qui catalyse la réaction d'oxydation réversible : G3P (Glycéraldéhyde-3-Phosphate) + NAD + (Nicotinamide adenine dinucléotide) + Pi (phosphate inorganique)  $\leftrightarrow$  NADH + H<sup>+</sup> + 1,3-Biphosphoglycérate. Il s'agit de la 6<sup>ème</sup> étape de la glycolyse, la voie métabolique d'assimilation du glucose qui libère de l'énergie métabolique sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) et du pouvoir réducteur par production de NADH + H<sup>+</sup>.

Les différentes étapes de la glycolyse (Figure 3) se déroulent dans le cytoplasme, nécessitant au départ du glucose et ayant pour produit le pyruvate. Ce dernier est métabolisé par fermentation en situation d'anaérobie pour produire du lactate. Il peut également entrer dans le cycle de Krebs dans la mitochondrie en aérobie.

Au-delà de cette fonction métabolique, la GAPDH possède de nombreux autres rôles tels que l'activation de la transcription, l'initiation de l'apoptose et le transfert de vésicules entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

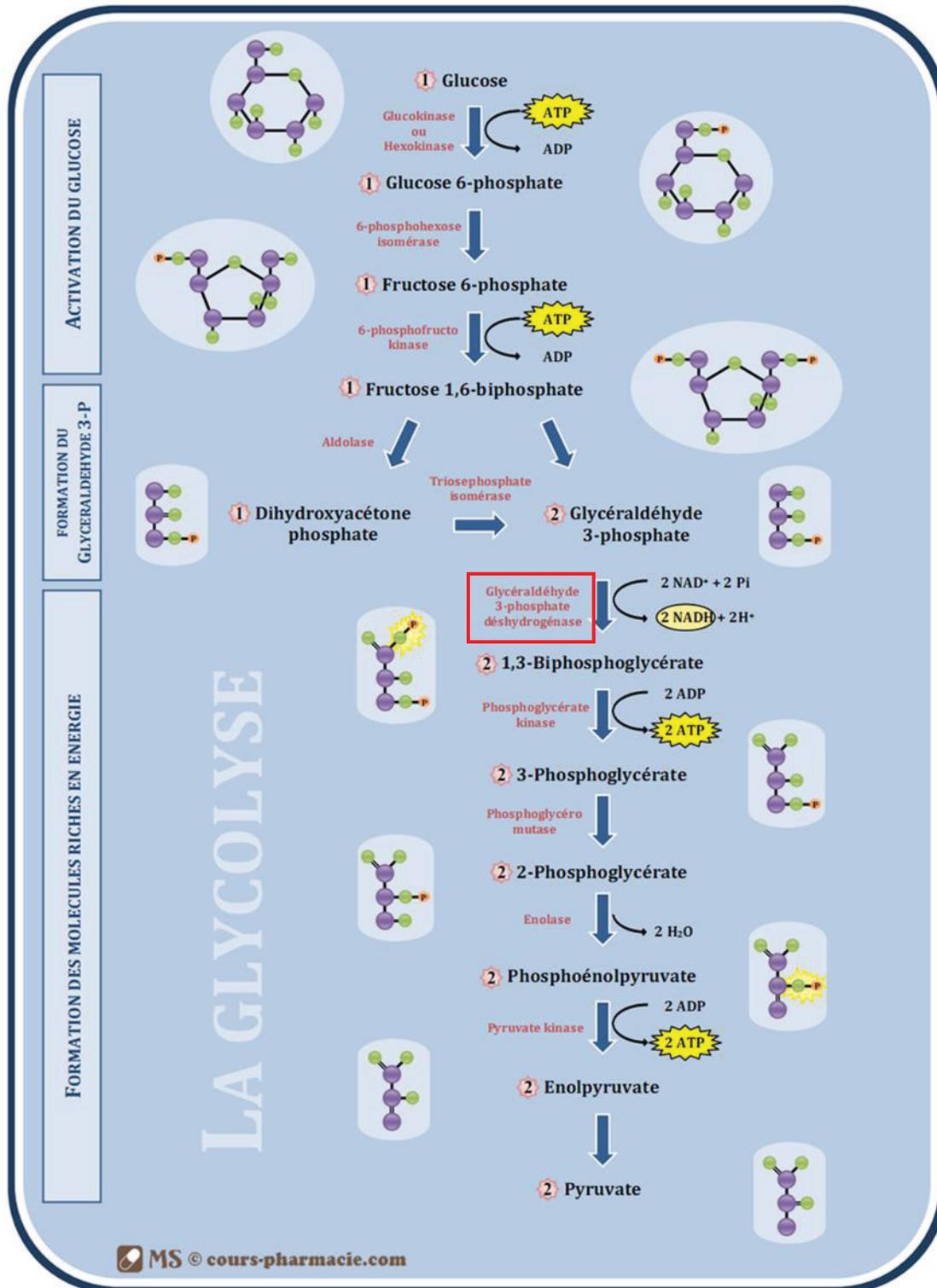


Figure 3. La glycolyse.

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est une enzyme qui catalyse la sixième étape de la glycolyse. Elle intervient dans la dégradation du glucose afin de produire de l'énergie et du pouvoir réducteur sous forme respectivement d'ATP et de  $\text{NADH} + \text{H}^+$ .

## 2. Structure

La GAPDH est un homotétramère constitué de 2 sous-unités dont la masse moléculaire de celles-ci varie de 34 à 38 kDa. Chaque sous-unité est constituée de 330 acides aminés formant 2 domaines. Le premier est impliqué dans la fixation du cofacteur NAD<sup>+</sup>, le second dans celle du substrat et dans la catalyse. Chaque sous-unité fixe une molécule de NAD<sup>+</sup>.

## 3. Fonctions non métaboliques de la GAPDH

Durant de nombreuses années, la GAPDH a été considérée comme une simple enzyme catalytique de la glycolyse, si stable que son gène est appelé gène de ménage et utilisée comme témoin de charge dans de nombreuses expériences scientifiques. Bien qu'il s'agisse de sa fonction principale, il est admis depuis récemment qu'elle joue de nombreux autres rôles, indépendants de sa fonction métabolique (Colell, A.<sup>52</sup>).

### a. Liaison aux acides nucléiques

La GAPDH possède la capacité de se lier aux acides nucléiques, notamment les ARNm avec des effets variés, voire opposés, sur leur stabilité et leur expression, dans les cellules normales mais également dans les cellules tumorales. Les domaines de fixation sont variables selon l'ARNm, impliquant parfois le domaine N-terminal ou nécessitant quelquefois les 2 domaines de GAPDH.

### b. GAPDH et télomères

La GAPDH possède également la capacité de transloquer au noyau et de se fixer aux brins d'ADN télomériques par son domaine de liaison au NAD<sup>+</sup> afin de les protéger de leur raccourcissement rapide induit par les traitements chimiothérapeutiques (Sundararaj KP. et al.<sup>53</sup>). Cependant, il n'est pas connu si la GAPDH joue un rôle dans le maintien des télomères en dehors d'un contexte de traitement par céramide.

Ce rôle de protection vis-à-vis des télomères paraît contradictoire avec le rôle pro-apoptotique de la GAPDH dans le cadre d'un stress cellulaire (voir ci-après).

### c. GAPDH, facteur de transcription

La GAPDH est également impliquée dans la régulation transcriptionnelle. La GAPDH fait partie d'un complexe co-activateur OCA-S nécessaire à la synthèse de l'histone-2B durant la phase S (Zheng, L.<sup>54</sup>). Dans un autre contexte, la liaison de la GAPDH au récepteur androgénique entraîne l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de ce dernier notamment dans les cancers de prostate (Harada N.<sup>55</sup>).

### d. Interaction avec les autres protéines

La GAPDH a la capacité de se lier à de nombreuses protéines et de réguler leur fonction. Il s'agit de protéines aux rôles divers pouvant participer à l'organisation des microtubules (Andrade J.<sup>56</sup>), facilitant le transport du reticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi (Tisdale EJ.<sup>57</sup>). Elle peut interagir avec la transferrine à la surface des macrophages (Raje CI.<sup>58</sup>), à APE1, une enzyme de réparation de l'ADN permettant de rétablir l'activité endonucléase de cette dernière (Azam S.<sup>59</sup>) et bien d'autres.

### e. GAPDH senseur de la disponibilité en glucose

La GAPDH fait le lien entre la disponibilité en glucose et la prolifération cellulaire. En condition de privation de glucose, la GAPDH se lie et séquestre la GTPase RHEB, inhibant ainsi l'activité du complexe mTOR (mammalian target of rapamycin) et donc la prolifération cellulaire (Lee MN.<sup>60</sup>). Une plus grande disponibilité en glucose augmente le flux glycolytique et donc la quantité de G3P, le substrat de la GAPDH, qui, en activant son activité catalytique, libère RHEB, restaurant la signalisation de la voie mTOR et donc la croissance cellulaire. La GAPDH est donc un senseur de la disponibilité cellulaire en glucose et couple ce signal à la prolifération cellulaire.

### f. GAPDH et apoptose

Le niveau de GAPDH est faible dans la mitochondrie en condition normale mais il s'élève en cas de stress cellulaire. La GAPDH peut se lier à un canal anionique entraînant la perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome C et d'AIF (apoptosis-inducing factor)

menant à la mort cellulaire par apoptose (Tarze A.<sup>61</sup>). Par ailleurs, Hara et al ont montré que GAPDH pouvait se lier à SIAH1 (seven in absentia homolog 1) transloquant alors au noyau et stabilisant l'activité de cette dernière qui est une E3 ubiquitine ligase facilitant la destruction de protéines nucléaires, induisant donc l'apoptose<sup>62</sup>.

De façon paradoxale, les Drs Colell et Ricci ont montré que la GAPDH protège de la mort cellulaire indépendante des caspases (CICD) induite par la perméabilisation de la membrane mitochondriale<sup>63</sup>. Ces résultats montrent que le rôle de la GAPDH dans la mort cellulaire est complexe et implique de multiples facteurs.

#### g. GAPDH, facteur de survie cellulaire

Au-delà du mécanisme de régulation de la prolifération cellulaire décrit au paragraphe e., la GAPDH facilite l'entrée en mitose de la cellule (Carujo S.<sup>64</sup>).

Il est largement établi que les cellules cancéreuses utilisent la glycolyse pour générer l'ATP, même en condition oxygénée (effet « Warburg ») et régulent positivement la GAPDH pour répondre à leurs besoins énergétiques (Révillion F.<sup>65</sup> ; Schek N.<sup>66</sup>).

La GAPDH joue donc un rôle crucial dans la régulation, positive ou négative, de la prolifération et de la survie cellulaire.

Ainsi, la GAPDH apparaît comme un senseur intracellulaire capable de relayer divers signaux aux différentes organelles et de participer à l'homéostasie cellulaire.

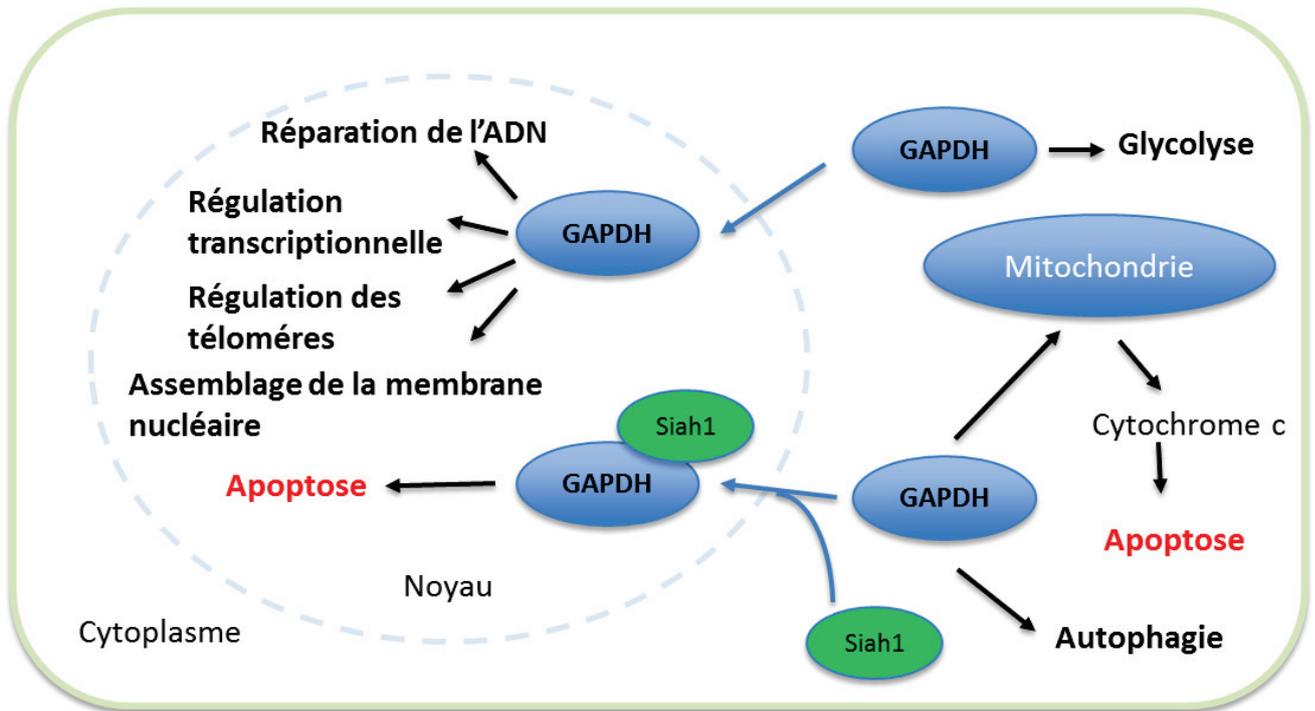


Figure 4. Les différents rôles de la GAPDH

#### 4. Régulation

La GAPDH est codée par un seul gène sur le chromosome 12 transcrit en un seul ARNm sans variant d'épissage connu. Son niveau d'expression génique varie en fonction de différents stimuli, comme le stress oxydatif et l'hypoxie qui entraînent tous deux son augmentation.

Certains facteurs affectent l'expression génique et les fonctions de GAPDH de manière complexe et imbriquée, notamment l'insuline (Alexander-Bridges M.<sup>67</sup>, Jacquin MA.<sup>68</sup>), HIF-1 (Manning BD.<sup>69</sup>), P53 (Chen RW.<sup>70</sup>), le monoxyde d'azote endogène (NO) (Bereta J.<sup>71</sup>).

Il a été décrit d'importantes modifications post-traductionnelles de la GAPDH pouvant modifier l'activité catalytique de la protéine ainsi que sa localisation.

La phosphorylation de GAPDH par de nombreuses kinases permet son action dans le trafic vésiculaire (Tisdale EJ.<sup>72</sup>). De plus, la GAPDH est capable de s'auto-phosphoryler, lui permettant d'exercer son activité kinase sur des cibles telles que le récepteur GABA<sub>A</sub> (Kawamoto RM.<sup>73</sup> ; Laschet JJ.<sup>74</sup>).

En conditions normales, la GAPDH est localisée préférentiellement dans le cytoplasme. Sa translocation au noyau est nécessaire pour nombre de ses fonctions comme la réparation de l'ADN, sa liaison aux télomères et son rôle pro-apoptotique. L'exportation de la GAPDH au noyau est liée à un site de liaison atypique de CRM-1 au niveau des résidus 259-271 de la région C-terminale. La mutation K259N de cette région entraîne l'abolition de l'interaction avec CRM-1 et donc une accumulation nucléaire de GAPDH (Brown VM.<sup>75</sup>).

Cette accumulation nucléaire n'est pas synonyme d'induction de l'apoptose (Kodama R.<sup>76</sup>) suggérant qu'au-delà de la localisation, des modifications de la conformation de GAPDH et/ou des interactions avec d'autres protéines sont nécessaires à sa fonction apoptotique. Par exemple la S-nitrosylation de la cystéine 152 de la GAPDH médiée par le NO abolie son activité catalytique et facilite son interaction avec Siah1 et donc sa translocation au noyau (Hara MR.<sup>62</sup>).

## 5. Rôle de la GAPDH dans les LNH

### a. Rôle de la GAPDH dans la croissance tumorale en l'absence de traitement

Le métabolisme singulier des tumeurs se manifeste par une forte production d'acide lactique qui résulte d'une glycolyse intense, dans un environnement oxygéné (effet «Warburg») (Warburg, O.<sup>77</sup>). L'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet «Warburg» a placé les enzymes de la glycolyse et les enzymes mitochondriales du cycle de Krebs (impliquées dans la phosphorylation oxydative, aussi appelée métabolisme 'OxPhos') au cœur de la compréhension du métabolisme énergétique des tumeurs. De façon intéressante, de nombreuses études sur le rôle des enzymes de la glycolyse dans la tumorigénèse ont révélé que la plupart d'entre elles possède des fonctions indépendantes de leur action enzymatique dans la glycolyse, dites fonctions 'non glycolytiques' (Kim, J.<sup>78</sup>, Wang, Q.<sup>79</sup>, Lucarelli, G.<sup>80</sup>, Zhu, X.<sup>81</sup>).

L'équipe du Dr Ricci a démontré que certains lymphomes B murins (modèle transgénique murin E $\mu$ -Myc (Zhu, D.<sup>82</sup>) développant spontanément des lymphomes B qui s'apparentent aux lymphomes B de type NH chez l'homme) surexpriment la GAPDH (Chiche, J.<sup>83</sup>). Cette surexpression participe au caractère agressif des lymphomes B par un mécanisme faisant intervenir l'interaction de la GAPDH avec la protéine associée au récepteur du TNF- $\alpha$ , TRAF2, dans un environnement hypoxique (1% O<sub>2</sub>). Il en résulte une augmentation de l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et HIF-1 et par conséquent, l'établissement d'un phénotype vascularisé et agressif de ces lymphomes (Figure 5).

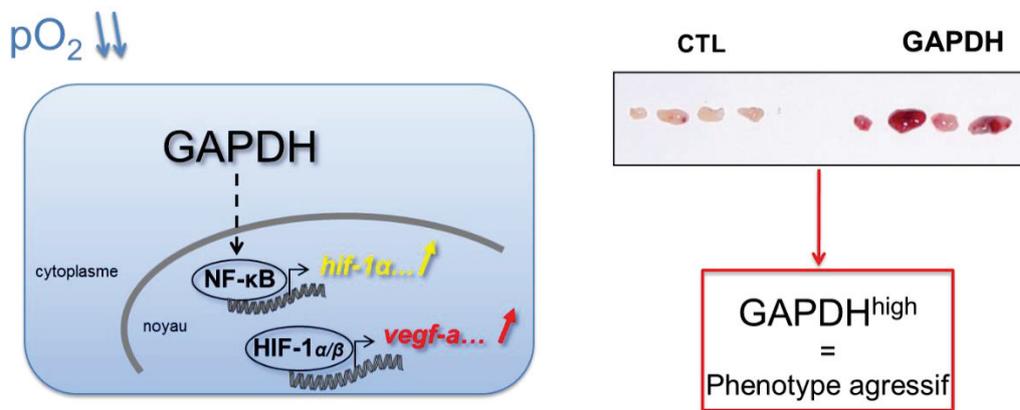


Figure 5. La surexpression de l'enzyme GAPDH est responsable d'un phénotype agressif dans un modèle de lymphome B murin.

Dans un environnement hypoxique, la surexpression de la GAPDH conduit à l'augmentation de l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et HIF-1 et par conséquent, l'établissement d'un phénotype vascularisé et agressif de ces lymphomes. Illustration du phénotype observé dans un ganglion de souris E $\mu$ -myc surexprimant la GAPDH.

#### b. Rationnel GAPDH/DLBCL : vers une nouvelle approche thérapeutique

Pour confirmer le rôle de la GAPDH dans les LNH humains, mon équipe s'est intéressée à une banque de données publiée et librement accessible (Lenz, G.<sup>6</sup>) comprenant les résultats d'analyse transcriptomique (Affimetrix) de biopsies de DLBCL au diagnostic. Par une analyse non biaisée, elle a montré que seuls 144 gènes sur l'ensemble du génome (soit plus de 50 000 gènes analysés) étaient capables de prédire des différences de survie en réponse au R-CHOP. Parmi les fonctions cellulaires associées à ces 144 gènes on retrouve des fonctions largement étudiées dans différentes néoplasies

comme la réparation de l'ADN, la croissance et la survie cellulaire... De façon intéressante, parmi les gènes codant pour les enzymes de la glycolyse, seule la *GAPDH* avait une valeur prédictive, renforçant le caractère unique de son rôle dans les DLBCL. L'équipe a ensuite confirmé l'existence de DLBCL qui expriment peu (DLBCL *GAPDH*-Low = DGL) ou plus (DLBCL *GAPDH*-High = DGH) de *GAPDH* (Figure 6A.). L'expression de la *GAPDH* pouvant influencer le phénotype tumoral (Chiche, J.<sup>83</sup>), l'équipe a émis l'hypothèse selon laquelle l'expression de la *GAPDH* pouvait également influencer la réponse au traitement des patients atteints de DLBCL. De manière inattendue, l'analyse bio-informatique des données de survie des patients traités au R-CHOP a permis de mettre en évidence qu'un niveau élevé de *GAPDH* dans les biopsies ganglionnaires prélevées au diagnostic est associé à une meilleure réponse thérapeutique. Ainsi, pour les 233 patients traités au R-CHOP, 46% des biopsies prélevées au diagnostic expriment un niveau élevé de *GAPDH* (Figure 6A) ce qui corrèle avec une meilleure survie (Figure 6B) comparativement aux patients présentant un DLBCL associé à une plus faible expression de *GAPDH*. Cette différence n'est pas observée pour les 181 patients traités au CHOP (Figure 6C). L'analyse des niveaux d'expression de l'ARNm des autres enzymes de la glycolyse n'a montré aucune corrélation avec la survie globale des patients, quelle que soit l'option thérapeutique mise en œuvre, ce qui suggère un rôle spécifique de la *GAPDH* dans la réponse au R-CHOP.

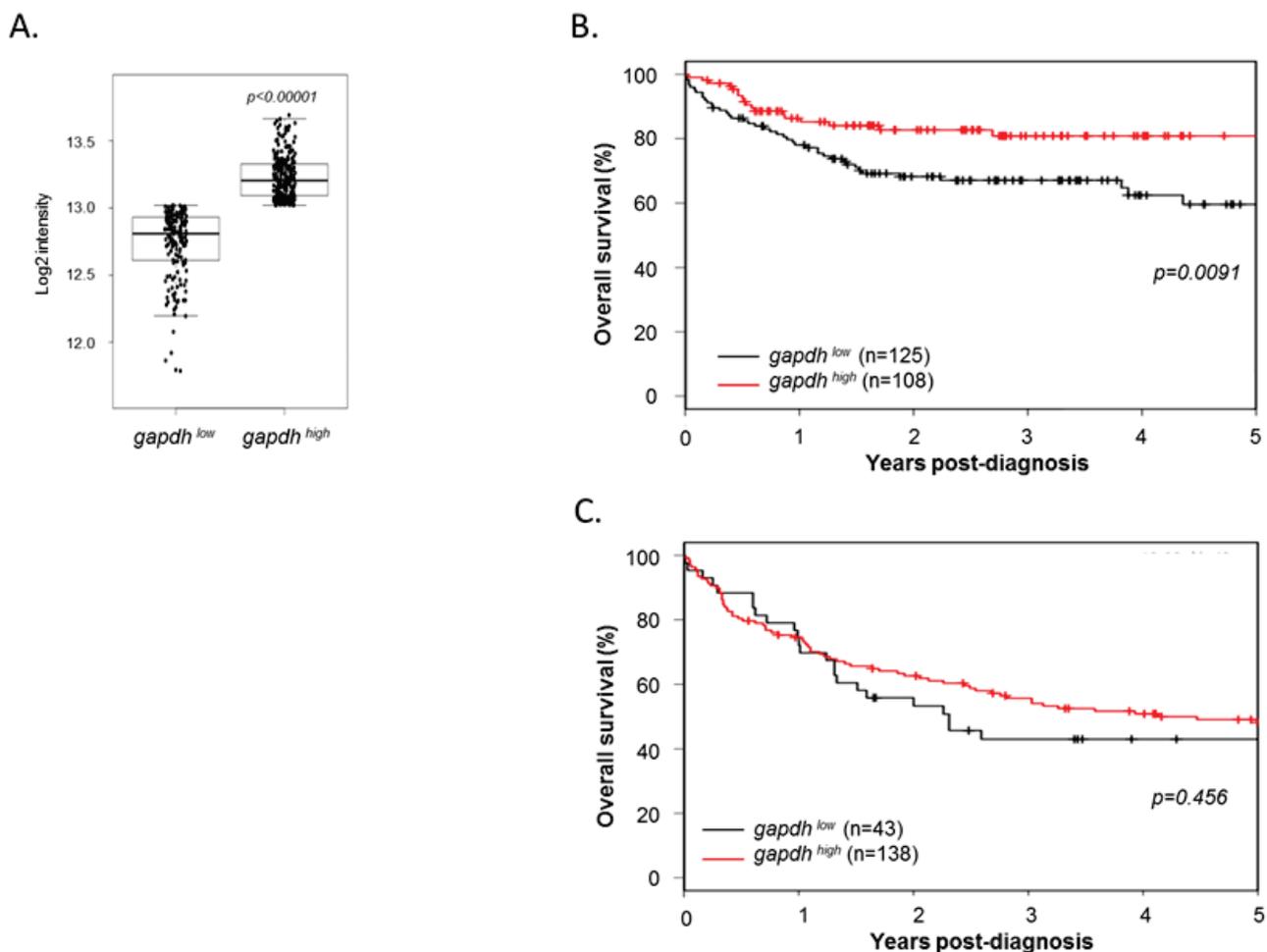


Figure 6 : Une expression élevée de l'ARNm de la GAPDH est associée à une bonne réponse thérapeutique pour les patients atteints de DLBCL traités au R-CHOP.

(A) Répartition des DLBCL traités au R-CHOP en fonction de l'expression de l'ARNm de la GAPDH (*GAPDH Low* n=125 ; *GAPDH High* n=108). (B et C) Courbes de survie en fonction du niveau d'expression de la GAPDH dans le groupe de patients traités par R-CHOP (B) et CHOP (C) (data SET de Lenz).

*La GAPDH est une enzyme de la glycolyse qui possède de nombreux autres rôles, notamment dans la prolifération et la survie cellulaire et dont la régulation est complexe. Sa surexpression est responsable d'un phénotype agressif des lymphomes B NH murins. De manière inattendue, une expression élevée de l'ARNm de la GAPDH est associée à une bonne réponse thérapeutique pour les patients atteints de DLBCL traités au R-CHOP, mais pas au CHOP seul.*

## OBJECTIFS

En dépit de l'avancée majeure des traitements avec l'immunothérapie qui, associée au traitement chimiothérapeutique conventionnel, augmente la survie (70% à 24 mois pour R-CHOP contre 57% pour CHOP) (Coiffier, B.<sup>42</sup>), **30 à 40% des patients atteints de DLBCL, sont en échec thérapeutique (réfractaires ou en rechute)** (Lenz, G.<sup>6</sup>).

A l'heure actuelle, les cliniciens n'ont que très peu d'alternatives thérapeutiques à leur disposition (comme la greffe de cellules souches hématopoïétiques) pour prendre en charge les DLBCL réfractaires au R-CHOP ou en rechute après ces traitements. **Il est donc impératif de mettre en évidence un nouveau marqueur permettant d'une part d'identifier au diagnostic les patients susceptibles d'être réfractaires au R-CHOP et d'autre part, d'orienter ces patients vers une nouvelle approche thérapeutique (associée au R-CHOP).** Les analyses préliminaires de l'équipe ont montré que seulement 144 gènes pouvaient prédire la réponse des DLBCL au R-CHOP (cf paragraphe B.5.b.). Parmi ces gènes figure **une seule enzyme de la glycolyse, la GAPDH.** À ce jour, le diagnostic d'un DLBCL est posé sur l'analyse anatomopathologique d'une biopsie ganglionnaire ou extra-ganglionnaire. Des marqueurs IHC sont indispensables à l'établissement du diagnostic et du pronostic.

Ainsi, l'objectif de mon travail de recherche se décompose en 2 étapes :

- 1) Objectif principal : La GAPDH (au niveau protéique) est-elle un marqueur IHC robuste permettant de prédire la réponse des DLBCL au R-CHOP ?**
- 2) Objectif secondaire : Par une approche anatomopathologique, peut-on identifier le mécanisme qui relie l'expression de la GAPDH à la réponse au R-CHOP ?**

## MATERIEL ET METHODE

### A. COHORTE DE DERIVATION

Nous avons réalisé une étude bi-centrique, non randomisée, en aveugle, rétrospective, sur des cas de DLBCL diagnostiqués au CHU Saint-Louis à Paris et au CHU de Nice entre mai 2008 et décembre 2014. Les patients ont reçu une information claire, loyale et appropriée et ont signé un formulaire de non opposition. Les critères d'inclusion sont : i) patients majeurs atteints de DLBCL (selon la classification 2008 des lymphomes de la World Health Organization) et traités par R-CHOP en première ligne, ii) biopsies au diagnostic, sur un prélèvement ganglionnaire, médiastinal, mésentérique ou rétropéritonéal, d'un DLBCL non secondaire à un lymphome de bas grade. Sont exclues les biopsies sur site différent des critères d'inclusion, DLBCL secondaires à un lymphome de bas grade, diagnostic de lymphome B riche en T ou de lymphome B médiastinal, biopsies inexploitable (nécrotiques, blocs épuisés...), biopsies à la rechute. Au total, à partir de 117 patients suivis au CHU de Nice et 53 suivis à l'Hôpital Saint-Louis à Paris, nous avons sélectionné 43 DLBCL prélevés au diagnostic répondant aux critères d'inclusion.

### B. COHORTE DE VALIDATION

Afin de valider les résultats obtenus lors de l'étude de notre cohorte de dérivation, nous avons exploité une seconde cohorte, en collaboration avec le groupe LYSA. Ce groupe de travail nous a fait parvenir des lames blanches de tissue microarray (TMA). Ces TMA regroupent 294 triplicats de biopsies de DLBCL (soit 882 spots), réalisées au diagnostic, provenant de l'étude prospective randomisée de phase 3 multicentrique GELA-LNH03-6B (Delarue, R.<sup>84</sup>). Celle-ci concernait 602 patients, âgés de 60 à 80 ans, atteints de DLBCL, biopsiés au diagnostic, présentant au moins un facteur de mauvais pronostic, randomisés pour recevoir 8 cycles de R-CHOP-14 ou 8 cycles de R-CHOP 21. Cette étude n'a pas montré de différence d'efficacité entre ces deux schémas thérapeutiques.

## C. ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

### 1. Généralités

L'immunohistochimie est une technique d'anatomopathologie robuste et largement reconnue dans les domaines de la médecine et en recherche scientifique. Cette technique consiste à révéler la présence d'un antigène spécifique au sein d'un tissu par une réaction immunologique. Cet antigène est ciblé par un anticorps primaire, lui-même révélé par un anticorps secondaire couplé à un chromogène.

L'IHC est utilisée quotidiennement dans les laboratoires d'anatomopathologie pour l'aide au diagnostic mais également à des fins pronostiques ou théranostiques. La réalisation et l'interprétation du marquage doit se faire de manière fiable et reproductible afin d'assurer la comparabilité inter-laboratoires.

### 2. Interprétation et quantification

Après validation des témoins internes et/ou externes, l'expression de l'antigène est recherchée. Il est important de définir la localisation de celui-ci : nucléaire, cytoplasmique ou membranaire. Une revue de la littérature a répertorié les différentes méthodes d'interprétation (Van Diest Paul J.<sup>85</sup>). Certains marqueurs sont évalués uniquement de manière qualitative, c'est-à-dire sur la présence ou non du marquage au niveau des cellules cibles, comme par exemple, la Pan-Kératine. On peut associer à cet item sa quantification en pourcentage de la population concernée, comme par exemple le Mib-1 qui est utilisé pour définir la proportion de cellules en cycle cellulaire. Certains marquages sont évalués de manière semi-quantitative en prenant en compte leur intensité (- ou 0 = négatif ; + ou 1 = faible ; ++ ou 2 = modéré ; +++ ou 3 = fort) et le pourcentage de cellules marquées, comme le statut HER dans le cancer du sein.

L'Histo-score permet une analyse encore plus fine, en réalisant la somme des pourcentages de cellules marquées pondérées par leur intensité (Mc Carty KS<sup>86</sup>).

### 3. Procédé standard de coloration automatisée

Après fixation des tissus par les méthodes standard (formaldéhyde tamponné 10%) et déshydratation progressive dans des bains d'alcool éthylique que l'on remplace par du xylène, substitué ensuite par de la paraffine liquide. Après inclusion en paraffine, les coupes du bloc de paraffine de 4 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome. Les lames sont placées à 37°C pendant 12h. Le laboratoire utilise une méthode automatisée pour le pré-traitement (PT Link, DAKO), la révélation et la contre coloration des lames (Autostainer link 48, DAKO). Le pré-traitement consiste à déparaffiner et réhydrater la coupe puis à démasquer l'antigène avec une solution au pH acide (6) ou basique (9). La révélation et la contre coloration se déroulent en plusieurs étapes automatisées : blocage de la peroxydase endogène pendant 5 min puis rinçage ; application de l'anticorps primaire (100 µL pendant 10 min) puis rinçage ; détection de l'anticorps primaire par application pendant 20 min de 100µL de réactif de détection Dako EnVision™ FLEX /HRP (SM802) suivi par un rinçage ; révélation par application de 200µL pendant 8 min d'un système de substrat formé de deux composants : le produit EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM827), une solution de diaminobenzidine (DAB) concentrée, et le tampon EnVision™ FLEX Substrate Buffer (SM803) contenant du peroxyde d'hydrogène ; rinçage ; contre-coloration à l'hématoxyline EnVision™ FLEX Hematoxylin (réf. K8008) 100µL pendant 5 min suivi d'un rinçage de 5 min dans du tampon de lavage puis d'un rinçage rapide dans de l'eau distillée. Les anticorps primaires utilisés sont récapitulés dans le tableau ci-après (sont notés en gras les anticorps utilisés en routine pour le diagnostic de DLBCL) :

Anticorps	<b>CD20</b>	<b>CD79a</b>	<b>BCL-2</b>	<b>BCL-6</b>	<b>CD10</b>	<b>MUM-1P</b>	P53	MYC
Compagnie	DAKO	DAKO	DAKO	DAKO	DAKO	DAKO	DAKO	ABCAM
Clone	L26	JCB 117	124	PG-B6p	56C6	MUM 1P	DO-7	Ab32072
Dilution	prédilué	1/100	prédilué	1/50	Prédilué	1/100	prédilué	1/100
pH	6	6	9	9	9	6	6	9

#### 4. Interprétation des IHC standards

Les données immunohistochimiques ont été recueillies à partir des compte rendus anatomopathologiques. Lorsqu'ils étaient manquants, les marquages ont été réalisés au Laboratoire Central d'Anatomopathologie du Pr Michiels au CHU de Nice et ont fait l'objet d'une interprétation en double aveugle, sans connaissance des caractéristiques des patients (Dr AMBROSETTI, Julie REVERSO-MEINIETTI).

Les immunomarquages BCL-2, BCL-6 et MYC ont été interprétés selon la méthode de Horn<sup>22</sup> (soit BCL-2 positif si > 1%, BCL-6 positif si > 25 %, MYC positif si > 40 %), les immunomarquages CD10, MUM-1 selon Hans<sup>7</sup> (soit positif si > 30%). Pour P53, le marquage était considéré négatif lorsqu'aucun noyau n'était marqué, positif lorsque plus de 10% des noyaux étaient fortement marqués et wild-type lorsque <10% des noyaux étaient marqués (Kaye, P. V.<sup>87</sup>). Le CD79a est un marqueur pan-B et nous a permis d'interpréter semi-quantitativement la positivité des cellules tumorales pour le CD20.

#### 5. Mise au point du marquage immuno-histochimique GAPDH

La mise au point a été réalisée sur un bloc en paraffine d'un carcinome rénal à cellules claires comportant également du tissu rénal sain péri-tumoral. Ces cancers présentent une mutation du gène VHL aboutissant à une stabilisation constitutive de HIF-1 qui conduit à une surexpression de la

GAPDH. Nous avons donc considéré comme fort (3+) le marquage au niveau des cellules tumorales du carcinome rénal.

Nous avons réalisé la mise au point du marquage automatisé de l'anticorps anti-GAPDH, clone HPA040067 SIGMA au LCAP, CHU de Nice. Après plusieurs tests, nous avons opté pour la condition : dilution 1/500, pH9.

## 6. Interprétation des marquages anti-GAPDH et anti-CD20 et établissement d'un score

### a. IHC GAPDH

Compte tenu de l'implication de la GAPDH dans le métabolisme glycolytique des tumeurs, nous avons pris en compte le marquage intra-cytoplasmique de la GAPDH. L'Histo-score est le score le plus exhaustif et nous a permis de définir un seuil pour séparer 2 groupes de tumeurs.

Le marquage IHC de la GAPDH a donc été interprété en fonction du pourcentage de cellules tumorales marquées ainsi que de l'intensité du marquage. Ce score prend en compte le marquage de l'ensemble de la biopsie. Nous avons compté le pourcentage de cellules tumorales faiblement marquées, cotées 1, modérément marquées, cotées 2 et fortement marquées, cotées 3. Nous avons multiplié le pourcentage par l'intensité correspondante. Enfin, nous avons additionné les 3, ce qui donne un score de 0 à 300. Pour la cohorte de dérivation, l'analyse a été réalisée sur lame entière de biopsies à l'aiguille ou de ganglion entier. Pour les TMA, nous disposions d'en moyenne 3 carottes biopsiques par patient sous forme de « spot » soit l'équivalent de plus de 800 spots. Nous avons scoré chaque spot indépendamment des autres. Pour tenir compte de l'hétérogénéité tumorale, nous avons ensuite réalisé une moyenne des scores des triplicats de chaque patient.

## b. IHC CD20

Dans notre cohorte de dérivation, nous avons établi le même système de score IHC pour le CD20 réalisant un score total sur 300. Notre témoin interne, côté 3 +, était le marquage d'un petit lymphocyte B réactionnel.

## D. ETUDE STATISTIQUE

La Survie Sans Progression (PFS, progression-free survival) est définie comme l'intervalle de temps entre la date au diagnostic initial de DLBCL et la date de progression de la maladie. La Survie Globale (OS, overall survival) est définie comme l'intervalle de temps entre la date au diagnostic initial de DLBCL et la date du décès du patient ou la date du dernier suivi. Concernant la cohorte de dérivation, les analyses de survie ont été réalisées en utilisant des courbes de Kaplan-Meier et ont été comparées par un test de log-rank (logiciel R).

Des analyses univariées et multivariées par régression logistique selon le modèle de Cox ont été utilisées pour l'IPIaa, BCL-2, BCL-6, P-53, MYC, CD20 et GAPDH. Pour le choix du seuil définissant les DGH / DGL et les CD20 High / CD20 Low, nous avons déterminé un cut-off optimal par méthode statistique de « positional scanning » en collaboration avec la plateforme bio-informatique du Canceropôle PACA (IPMC, Sophia Antipolis).

Concernant la cohorte de validation, j'ai adressé les Histo-scores GAPDH au Pr. Mounier qui a ensuite réalisé l'analyse statistique selon la procédure standard d'analyse du LYSA.

## RESULTATS

### A. L'expression IHC de la GAPDH est un marqueur prédictif de la réponse au R-CHOP

#### 1. Expression IHC de la GAPDH dans les DLBCL au diagnostic

Pour notre cohorte de dérivation, à partir de 170 patients suivis au CHU de Nice et à l'Hôpital Saint-Louis à Paris, nous avons sélectionné 43 DLBCL prélevés au diagnostic répondant aux critères d'inclusion. Les caractéristiques cliniques et démographiques des patients sont récapitulées dans la Table 1. La médiane de survie des patients en vie était de 1275 jours (soit 3,5 ans, entre 217 et 1996 jours).

Nous avons réalisé et interprété le marquage avec l'anticorps anti-GAPDH pour chacun des 43 patients (Figure 7).

Par méthode statistique (voir paragraphe Matériel et Méthode) nous avons déterminé une valeur seuil optimale à 150 pour définir les DLBCL-DGH (groupe DGH, score IHC GAPDH > 150, n=28) et les DLBCL-DGL (groupe DGL, score IHC GAPDH ≤ 150, n=15) (Figure 8).

Aucune différence clinique significative n'est observée entre les 2 groupes (DGH et DGL) hormis l'IPIaa. En effet, 59,5% (29/43) des patients de la cohorte ont un lymphome agressif cliniquement (IPIaa ≥ 2). Dans le groupe DGL, 14 des 15 patients ont un IPIaa ≥ 2. Le sous-groupe IPIaa élevé est intéressant car on y retrouve la majorité des patients résistants au R-CHOP. Ce sous-groupe sera décrit ultérieurement (paragraphe Résultats. III. A. 2.).

À partir des TMA de la cohorte LNH03-6B du LYSA, nous avons confirmé des niveaux d'expression de la GAPDH différents. Cette cohorte de validation est constituée de triplicats de 294 patients dont les caractéristiques cliniques et démographiques sont récapitulées dans la Table 1. En appliquant le cut off optimal défini dans la cohorte de dérivation, nous avons pu distinguer 90 DGH et de 204 DGL (Figure 8). Aucune différence clinique n'est observée entre les DGH et les DGL. (Table 1).

<b>Table 1.</b> Patient demographic and clinical characteristic in the training and in the validation cohort.											
		<b>TRAINING COHORT (n=43)</b>					<b>VALIDATION COHORT (n=294)</b>				
Characteristic		GAPDH low (n=15)		GAPDH high (n=28)		p	GAPDH low (n=204)		GAPDH high (n=90)		p
		No.	%	No.	%		No.	%	No.	%	
<b>Age</b>	Mean	72.00		64.00		0.1374	70.23		70.35		0.4457
	Range	39-83		24-85			60-80		60-80		
<b>Sexe</b>	Male	6	40.0	14	50.0	0.5309	111	54.4	46	51.1	0.6141
	Female	9	60.0	14	50.0		93	45.6	44	48.9	
<b>aalPI score</b>	0-1	1	6.7	13	46.4	0.0299	82	40.2	31	34.4	0.3411
	2	9	60	10	35.7		96	47.1	42	46.7	
	3	5	33.3	5	17.7		26	12.7	17	18.9	
<b>Hans classification</b>	GCB	13	86.7	15	53.6	0.0875	68*	38.6	40*	45.4	0.3527
	non-GCB	2	13.3	13	46.4		108*	61.4	48*	54.6	
<b>COO classification</b>	GCB	∓		∓			16**	37.2	7**	41.2	0.9217
	ABC	∓		∓			22**	51.2	8**	47	
	Unclassified	∓		∓			5**	11.6	2**	11.8	

Abbreviations: GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; aalPI, age-adjusted International Prognosis Index ; COO classification, cell-of-origin classification (Hans algorithm); GCB, Germinal Center B cells  
 \*30 samples could not be scores  
 \*\*234 samples could not be scored

Table 1. Caractéristiques cliniques et démographiques des patients de la cohorte de dérivation (n=43) et de la cohorte de validation (n=294).

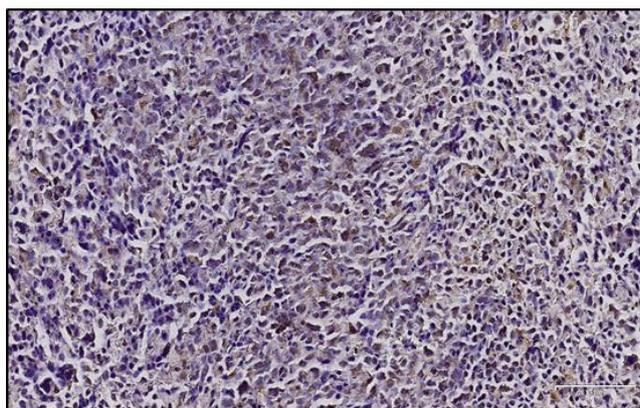
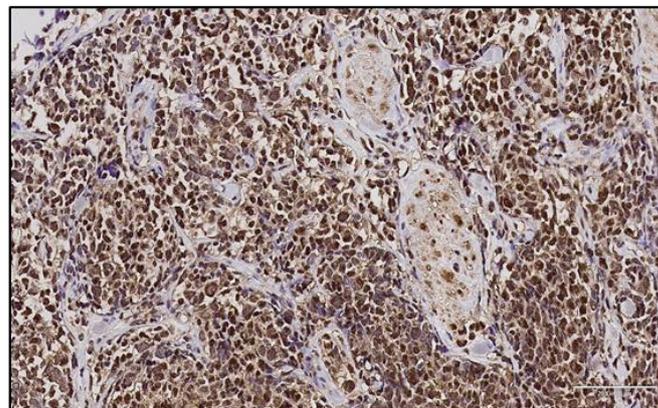
DLBCL-GAPDH <sup>low</sup>DLBCL-GAPDH <sup>high</sup>

Figure 7. Illustration de l'expression IHC de la GAPDH dans des biopsies ganglionnaires de patients atteints de DLBCL, prélevées au diagnostic.

A gauche, un exemple de marquage IHC de DGL. A droite, un exemple de marquage IHC de DGH. (objectif x400).

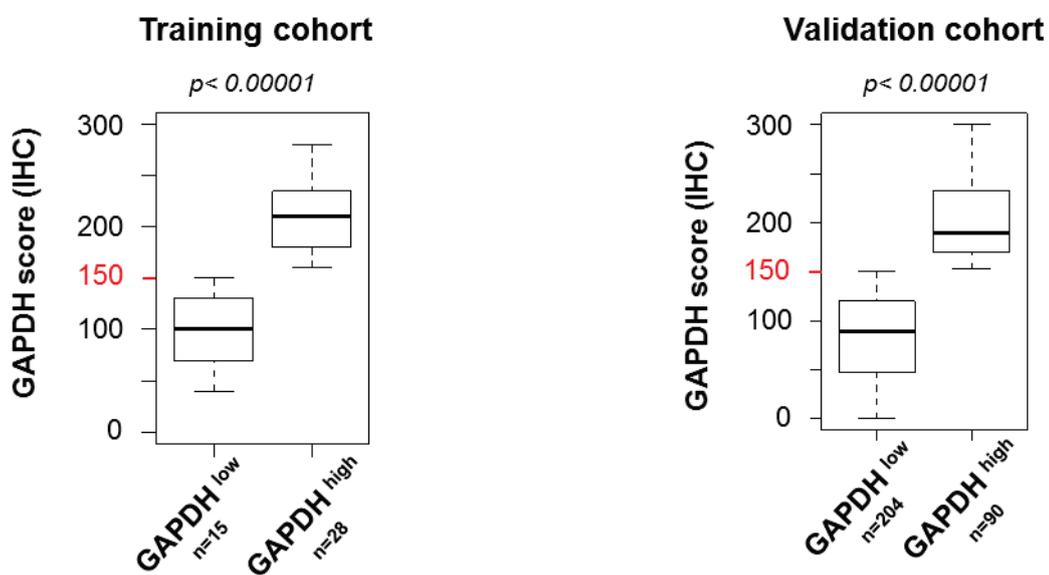


Figure 8. Répartition des DLBCL en fonction du score IHC GAPDH dans les deux cohortes.

## 2. La GAPDH est un marqueur prédictif de la réponse au R-CHOP

Nous avons tracé les courbes de survie en fonction de l'expression IHC de la GAPDH. Dans la cohorte de dérivation, une expression élevée de la GAPDH au diagnostic est associée à une meilleure survie globale que pour les patients atteints d'un DGL ( $p < 0.0001$ ). La survie globale à 4 ans est de 75 % pour les DGH contre 20 % pour les DGL ( $p < 0,0001$ ) (Figure 9) et la survie sans progression à 4 ans est de 71 % pour les DGH contre 7 % pour les DGL ( $p < 0,00001$ ) (Figure 10).

Nous avons pu confirmer la valeur prédictive de la GAPDH dans la cohorte de validation puisque les patients DGH ont une survie globale supérieure aux DGL ( $p = 0,0242$ ) (Figure 9). La même tendance est observée pour la PFS ( $p = 0,0686$ ) (Figure 10).

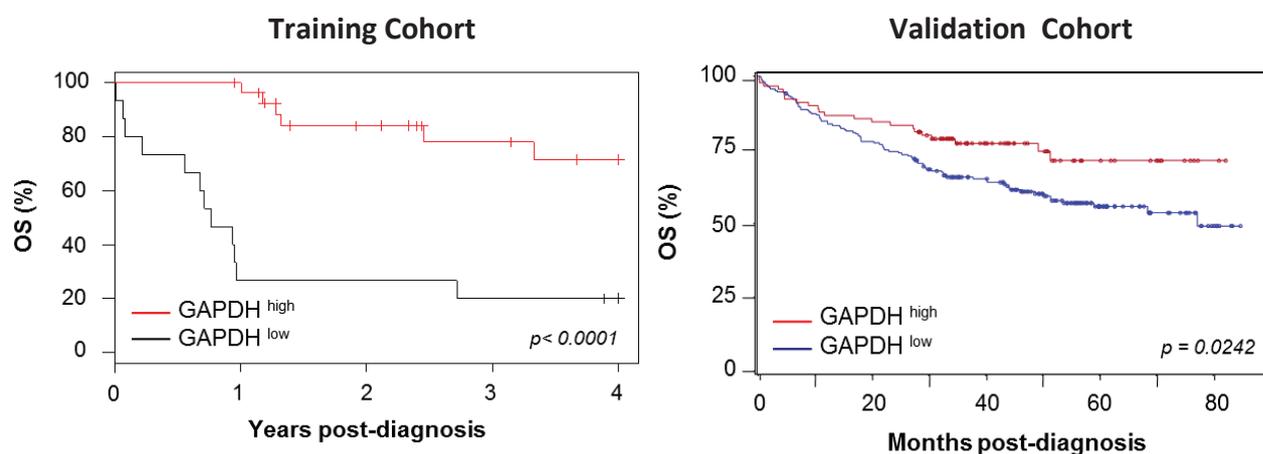


Figure 9. La GAPDH est un marqueur de la survie globale des DLBCL traités par R-CHOP.

Courbes de survie globale (OS) en fonction des niveaux d'expression IHC de la GAPDH dans la cohorte de dérivation (DGH :  $n = 28$  ; DGL :  $n = 15$ ) et dans la cohorte de validation (DGH :  $n = 90$  ; DGL :  $n = 204$ ).

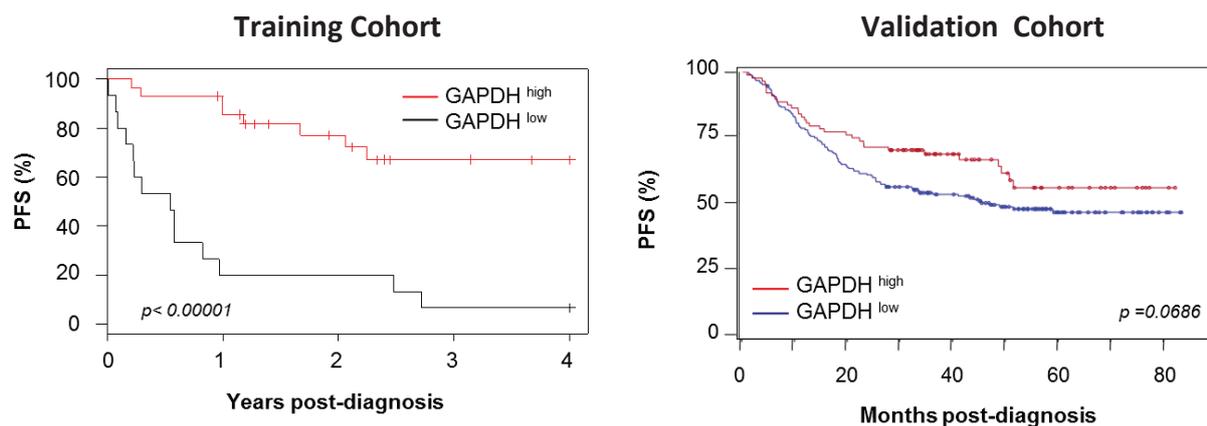


Figure 10. La GAPDH est un marqueur de la survie sans progression des DLBCL traités par R-CHOP.

Courbes de survie sans progression (PFS) en fonction des niveaux d'expression IHC de la GAPDH dans la cohorte de validation (DGH : n= 90 ; DGL : n= 204) et dans la cohorte de validation (DGH : n = 90 ; DGL : n = 204).

Pour éviter le biais de confusion lié à la répartition hétérogène des IPIaa en fonction de l'expression de la GAPDH, nous avons comparé la GAPDH et l'IPIaa comme variables dépendantes en fonction de la survie globale et la survie sans progression dans nos 2 cohortes. L'expression de la GAPDH apparaît comme un marqueur prédictif indépendant (Table 2).

<b>Table 2. Multivariate analysis of GAPDH and aalPI with progression-free survival and overall survival in patients with DLBCL treated with R-CHOP (training and validation cohort)</b>								
Variable	<b>TRAINING COHORT (n=43)</b>				<b>VALIDATION COHORT (n=294)</b>			
	<b>PFS</b>		<b>OS</b>		<b>PFS</b>		<b>OS</b>	
	HR*	p	HR*	p	HR*	p	HR*	p
<b>aalPI score 0-1</b>	1.8205	0.295	1.0727	0.9065	1.863	<0.0001	2.121	<0.0001
<b>GAPDH high expression</b>	0.1638	0.0001	0.1397	0.0002	0.627	0.0192	0.517	0.0063

Abbreviations: aalPI, age-adjusted International Prognostic Index; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PFS, progression-free survival; OS, overall survival; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; R-CHOP, Rituximab with cyclophosphamide, doxorubicin, oncovin, and prednisone; HR, hazard ratio. \* HR greater than 1 indicates a factor with poor prognosis, whereas a ratio of 1 or less indicates a factor with good prognosis.

Table 2 : Survies globale et sans progression en fonction des niveaux d'expression IHC de la GAPDH et de l'IPIaa en analyse multivariée.

B. Quel mécanisme relie l'expression de la GAPDH à la réponse thérapeutique au R-CHOP : approche anatomopathologique

1. La GAPDH a une valeur prédictive indépendante des autres marqueurs pronostiques IHC utilisés en clinique

Pour expliquer la valeur pronostique de la GAPDH, nous avons recherché dans notre cohorte de dérivation une corrélation entre l'expression de la GAPDH et l'expression des autres marqueurs pronostiques IHC tels que BCL-2, BCL-6, P53 et MYC. Comme montré en Table 3, il n'y a pas de corrélation avec BCL-2, BCL-6, P53. Par contre on observe une corrélation inverse avec MYC.

<b>Table 3. Comparison of GAPDH protein expression with other biomarkers in the training cohort (n=43)</b>				
Biomarker		<b>GAPDH expression</b>		<i>p</i>
		High	Low	
Bcl2	Positive	23	14	<i>0.318</i>
	Negative	5	1	
Bcl6	Positive	10	9	<i>0.126</i>
	Negative	18	6	
p53	Positive	11	9	<i>0.1943</i>
	Negative	17	6	
Myc*	Positive	4	10	<i>6.3e-04</i>
	Negative	23	5	

Abbreviations: GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; R-CHOP, Rituximab with cyclophosphamide, doxorubicin, oncovin, and prednisone.\* One sample could not be scored

Table 3. Comparaison de l'expression de la GAPDH avec celle d'autres marqueurs pronostiques IHC dans la cohorte de dérivation.

En analyse univariée (Table 4), aucun des marqueurs pronostiques IHC habituels n'apparaît comme significativement pronostique en dehors de MYC. En effet, comme décrit dans la littérature, une expression IHC de MYC > 40 % est associée à une mauvaise réponse au R-CHOP (HR : 5,523 ; IC : 2.033-15.01 ;  $p = 8.06e-04$ ).

Pour vérifier si la valeur prédictive de l'expression de la GAPDH est liée aux autres facteurs pronostiques IHC et notamment MYC, nous les avons comparés comme variables dépendantes avec l'OS en utilisant une analyse de régression multivariée selon le modèle de Cox (Table 4). La majorité des événements survenant au cours de la première année (Figures 9 et 10), nous avons choisi de prendre en compte la survie globale à 1 an pour 40 ans patients (pour 3 patients DGH, nous avons un suivi inférieur à un an).

**Table 4.** Univariate and multivariate analysis of GAPDH and other biomarkers expression with overall survival in DLBCL treated with R-CHOP

Variable	Overall Survival			Overall Survival		
	HR	Univariate 95% CI	<i>p</i>	HR	Multivariate 95% CI	<i>p</i>
GAPDH high IHC	0.1373	0.0507-0.372	<i>9.32e-05</i>			
GAPDH high IHC				0.1492	0.054-0.413	<i>0.0002</i>
BCL-2 IHC (>1%)	3.446	0.457-25.95	<i>0.230</i>	1.8220	0.230-14.418	<i>0.5697</i>
GAPDH high IHC				0.1331	0.048-0.372	<i>0.0001</i>
BCL-6 IHC (>25%)	1.460	0.577-3.691	<i>0.424</i>	0.8904	0.339-2.336	<i>0.8135</i>
GAPDH high IHC				0.1412	0.051-0.387	<i>1.41e-04</i>
P53 IHC (>10%)	1.604	0.632-4.07	<i>0.32</i>	1.1919	0.462-3.072	<i>0.7163</i>
GAPDH high IHC				0.1750	0.055-0.554	<i>0.0030</i>
Myc IHC (>40%)	5.523	2.033-15.01	<i>8.06e-04</i>	2.7828	0.359-0.934	<i>0.0660</i>

HR greater than 1 indicates a factor with poor prognosis, whereas a ratio of 1 or less indicates a factor with good prognosis.

Table 4. Survie globale en fonction de l'expression de la GAPDH et des autres marqueurs pronostiques en analyse univariée et multivariée dans la cohorte de dérivation.

Ainsi, comme décrit dans la Table 4, l'expression IHC de la GAPDH prédit statistiquement mieux que les autres marqueurs IHC la réponse au traitement des DLBCL. En effet, seule la GAPDH

apparaît statistiquement significative avec un Hazard Ratio inférieur à 0,04 et un  $p < 0,005$ , indépendamment de l'expression de MYC.

En analyse multivariée, la GAPDH apparaît donc comme un marqueur prédictif de la réponse des DLBCL au R-CHOP et indépendant aux autres marqueurs pronostiques IHC décrits dans la littérature (Table 4).

## 2. Corrélation entre l'expression protéique de la GAPDH et de CD20

Les analyses bio-informatiques effectuées à partir des données cliniques et du profil d'expression génique des cohortes de Lenz<sup>6</sup> ont montré que l'expression de la GAPDH influence la réponse des DLBCL au R-CHOP, mais pas au CHOP. Ce résultat suggère un rôle fondamental de la GAPDH dans la réponse au Rituximab (Figure 6, paragraphe Introduction. B. 5. b.).

L'efficacité du Rituximab dépendant du nombre de cellules exprimant CD20 et de la quantité de CD20 exprimé à la surface des lymphocytes (Singh, V.<sup>88</sup>, Golay, J.<sup>89</sup>) nous avons postulé qu'il existait une association entre les niveaux d'expression de la GAPDH et de CD20.

Nous avons ainsi interprété rétrospectivement les marquages IHC anti-CD20 qui avaient été effectués sur les biopsies ganglionnaires des 43 patients de notre cohorte de dérivation. De la même façon que pour la GAPDH, l'immunoscore de CD20 tient compte du nombre de cellules, de l'intensité du marquage.

En traçant une courbe de régression linéaire, on observe une corrélation significative entre l'expression de la GAPDH et de CD20 ( $R=0,586$  ;  $p<0,0001$ ) (Figure 11).

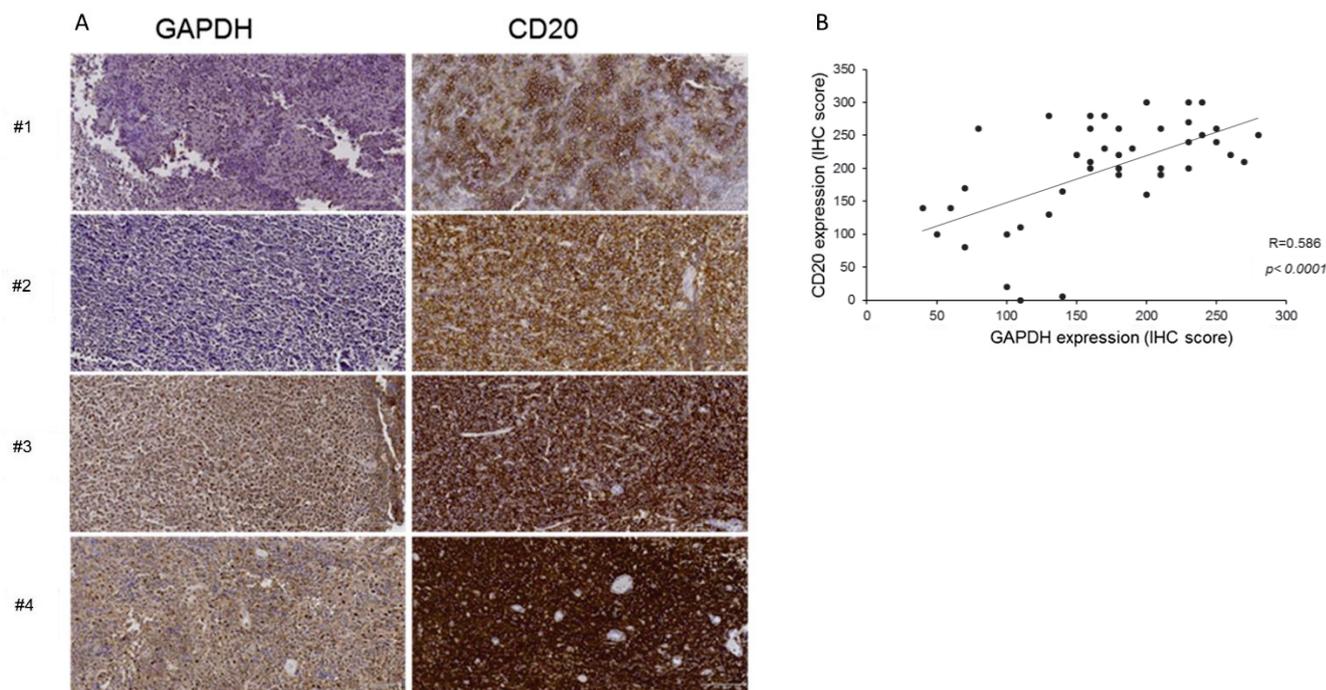


Figure 11. L'expression IHC de la GAPDH corrèle à celle de CD20 dans les biopsies ganglionnaires des patients atteints de DLBCL.

A : Illustration de l'expression IHC de la GAPDH (à gauche) et de CD20 (à droite) dans 4 biopsies ganglionnaires de patients atteints de DLBCL, prélevées au diagnostic (#1 et #2 : DGL-CD20 Low ; #3 et #4 : DGH-CD20 High). B : Courbe de régression linéaire entre l'expression protéique de la GAPDH et de CD20 dans l'ensemble des biopsies ganglionnaires de patients atteints de DLBCL de la cohorte de dérivation, prélevées au diagnostic.

Par méthode statistique (voir paragraphe Matériel et Méthode) nous avons déterminé une valeur seuil optimale à 160 pour définir les DLBCL exprimant fortement le CD20 (CD20 High  $\geq$  160) de ceux l'exprimant plus faiblement (CD20 Low  $<$  160).

En analyse univariée, le CD20 apparaît comme marqueur prédictif de la réponse des DLBCL au R-CHOP. En analyse multivariée, l'expression IHC de la GAPDH prédit statistiquement mieux que le CD20 la réponse au traitement des DLBCL (Table 5).

<b>Table 5.</b> Univariate and multivariate analysis of GAPDH and CD20 expression with overall survival in DLBCL						
	Univariate			Multivariate		
	<b>Overall Survival</b>			<b>Overall Survival</b>		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
GAPDH high IHC	0.1373	0.0507-0.372	9.32e-05	0,0358	0,004-0,347	0,0041
CD20 high IHC	0.1246	0.047-0.332	3.14e-05	0,5462	0,142-2,097	0,3783

HR greater than 1 indicates a factor with poor prognosis, whereas a ratio of 1 or less indicates a factor with good prognosis.

Table 5. Survie globale en fonction de l'expression de la GAPDH et de CD20 en analyse univariée et multivariée dans la cohorte de dérivation.

Les DGL étant moins bons répondeurs à l'immuno-chimiothérapie, il semble que cette résistance au R-CHOP puisse s'expliquer en partie par une plus faible expression du CD20 par les lymphocytes B tumoraux. Le rôle de la GAPDH dans la régulation de l'expression de CD20 dans les DLBCL fait actuellement l'objet d'un projet de recherche mené par le Dr Chiche dans l'équipe du Dr. Ricci. L'étude de l'expression en IHC du CD20 sur la cohorte de validation du LYSA est en cours.

Ainsi, le marquage IHC de la GAPDH apparait comme un examen simple, reproductible par son système de score et réalisable en routine au laboratoire d'anatomopathologie. Nos observations sur l'expression de la GAPDH et celle de CD20 ont été validées par les Professeurs d'anatomopathologie Christiane Copie-Bergman et Thierry Molina, référents nationaux en pathologie lymphoïde et membres du LYSA.

## DISCUSSION

### A. PRINCIPAUX RÉSULTATS

Les DLBCL sont les plus fréquents des lymphomes B non hodgkiniens. Il s'agit de lymphomes agressifs, hétérogènes sur le plan clinique, moléculaire, métabolique et au pronostic variable. Des facteurs pronostiques, notamment l'IPI, permettent d'identifier au diagnostic les lymphomes les plus agressifs mais il semble que des patients présentant le même IPI répondent différemment au traitement actuel. L'utilisation en routine de l'immunothérapie date du début des années 2000 et a largement amélioré la survie des patients. Mais depuis, aucune nouvelle classe thérapeutique n'a été développée et 30 à 40 % des DLBCL restent en échec thérapeutique. De nouvelles générations d'anticorps anti-CD20 sont en cours de développement mais il apparaît important de développer des alternatives thérapeutiques qui prennent en compte l'hétérogénéité moléculaire et métabolique (Monti, S.<sup>10</sup>) des DLBCL.

**Nous avons montré que l'expression de la GAPDH en IHC était un marqueur prédictif robuste et indépendant de la réponse des DLBCL au R-CHOP**, les « DGL » apparaissant comme mauvais répondeurs au R-CHOP. L'évaluation de l'expression de la GAPDH par IHC est simple, reproductible, peu onéreuse et applicable en pratique clinique quotidienne. Une des perspectives de ce travail consiste à proposer une nouvelle approche thérapeutique dont l'efficacité dépendrait des niveaux d'expression du biomarqueur GAPDH (cf Perspectives).

Nous avons cherché à comprendre par quels mécanismes l'expression de la GAPDH pouvait favoriser la réponse au R-CHOP. **Nous avons montré que son expression était indépendante du facteur pronostique IPIaa et des autres biomarqueurs IHC pronostiques** influençant la réponse aux traitements tels que BCL-2, BCL-6, P53 et MYC.

L'analyse bio-informatique des données cliniques et biologiques de la cohorte de Lenz<sup>6</sup> a permis de mettre en évidence qu'un niveau élevé de *GAPDH* dans les biopsies ganglionnaires prélevées au

diagnostic est associé à une meilleure réponse thérapeutique chez les 233 patients traités au R-CHOP que chez les patients présentant un DLBCL associé à une plus faible expression de *GAPDH*. Cette différence n'est pas observée pour les 181 patients traités par CHOP. Le Rituximab étant un anticorps monoclonal anti-CD20, nous nous sommes intéressés au lien entre *GAPDH* et CD20.

**Nous avons montré qu'une expression élevée de la *GAPDH* corrèle à une expression élevée du CD20.** La quantification du CD20 en IHC dans la cohorte de validation du LYSA est en cours et fera l'objet d'une comparaison avec celle de la *GAPDH*.

La quantification du CD20 par IHC n'est pas utilisée comme marqueur prédictif de la réponse au Rituximab car bien que nous ayons montré une corrélation entre *GAPDH* et CD20, seule la *GAPDH* garde une valeur prédictive en analyse multivariée.

## B. LIMITES

Notre cohorte de dérivation est composée de cas plus agressifs que ceux retrouvés dans les autres études à plus grande échelle (Maurer, M. J.<sup>90</sup>). Cela peut en partie s'expliquer par le fait que nous avons été très exigeants sur nos critères d'inclusion comme notamment l'exclusion des DLBCL secondaires à des lymphomes de bas grade et les lymphomes B du médiastin. De plus, l'IPIaa n'apparaît pas comme un facteur pronostique indépendant en analyse multivariée ; cela peut s'expliquer en partie par le faible effectif de notre cohorte. Nous pouvons néanmoins extrapoler nos résultats aux patients ayant des lymphomes agressifs, sous-groupe intéressant car avec un mauvais pronostic et pour lequel comprendre les mécanismes de résistance est primordial.

Par ailleurs, la répartition des DGH et DGL n'est pas identique dans les 2 cohortes. En effet, on observe plus de DGL dans la cohorte de validation que dans la cohorte de dérivation. Il est important de rappeler que la cohorte de validation provient d'un essai thérapeutique (Delarue,<sup>84</sup>) dont les critères d'inclusion étaient différents, sélectionnant des DLBCL de mauvais pronostic (patients âgés avec au

moins un facteur de risque). En outre, l'évaluation du score de la GAPDH a été réalisée sur TMA, ce qui ne permet pas de bien prendre en compte l'hétérogénéité tumorale.

Dans notre cohorte de dérivation, aucun des biomarqueurs IHC décrits habituellement (BCL-2, BCL-6, P53 et MYC) n'est statistiquement significatif en analyse multivariée mais les études n'utilisant pas toutes les mêmes seuils de positivité, il est difficile d'en tirer une conclusion. Par ailleurs, la valeur pronostique de ces biomarqueurs est sujette à controverse (Horn, H.<sup>22</sup>, Hermine, O.<sup>28</sup>, Hill, M. E.<sup>29</sup>, Perry, A. M.<sup>91</sup>).

Nous n'avons pas pu réaliser initialement l'analyse multivariée en fonction de la COO moléculaire. En effet, il s'agit d'une analyse non réalisée en routine et non disponible dans notre cohorte de dérivation. En collaboration avec le service d'anatomopathologie de l'Hôpital Saint-Louis à Paris et l'équipe du Professeur Jardin<sup>92</sup> qui a développé récemment un nouvel outil permettant la réalisation de cette analyse par RT-MLPA (Reverse Transcriptase–Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification), nous espérons obtenir ces informations prochainement. Néanmoins, la quantité de matériel restant étant faible, il est probable que l'analyse ne soit pas contributive pour beaucoup d'échantillons. Le LYSA a réalisé cette analyse pour 60 patients de notre cohorte de validation et les analyses statistiques sont en cours. En ce qui concerne la COO selon l'algorithme de Hans, notre cohorte de dérivation est probablement trop faible pour en tirer des conclusions. Bien qu'il n'y ait pas de différence significative de répartition des DLBCL-GCB et non-GCB dans notre cohorte de dérivation, les DLBCL non-GCB sont essentiellement des DGH. Or, il est décrit dans la littérature que les DLBCL non-GCB sont de moins bon pronostic (Hans, C. P.<sup>7</sup>). Dans la cohorte de validation, il apparaît que la GAPDH en IHC a une valeur prédictive dans le sous-groupe GCB-DLBCL mais pas dans les ABC-DLBCL (figures non incluses). Cependant, cette classification IHC ne corrèle pas parfaitement avec la classification moléculaire (Gutiérrez-García, G.<sup>9</sup>). De plus, il semblerait qu'avec l'ajout du Rituximab la valeur pronostique de la classification de Hans ne soit plus valable (Nyman, H.<sup>93</sup>).

Il est décrit dans la littérature que les DLBCL double ou triple hits sont de mauvais pronostic. Il apparaît donc intéressant d'étudier ce facteur pronostique afin de vérifier que les DGL ne sont pas des double ou triple hits. L'analyse FISH pour mettre en évidence les translocations *MYC*, *BCL-2* et *BCL-6* dans la cohorte de dérivation est actuellement en cours. Néanmoins, nous savons que ces DLBCL représentent moins de 10% de l'ensemble des DLBCL et il apparaît peu probable que tous les DGL soient des double ou triple hits. La répartition des translocations de *MYC* dans la cohorte de validation est quasiment identique dans les deux groupes.

Dans la mise à jour de l'OMS 2016, il est décrit un nouveau type de DLBCL au pronostic intermédiaire entre les DLBCL NOS (not otherwise specified) et les double/triple hits. Il s'agit des DLBCL « double exprimeurs », surexprimant en IHC *BCL-2* et *MYC*. Le seuil utilisé pour *BCL-2* est de 70% de cellules tumorales marquées. Le seuil établi pour évaluer la valeur pronostique de *BCL-2* selon Horn était de 1%. Notre étude ayant commencé en 2014, nous avons donc utilisé le cut-off de 1%. Il serait intéressant de réévaluer l'expression IHC de *BCL-2* en tenant compte du seuil de 70% afin de tester cette nouvelle entité en analyse multivariée.

### C. PERSPECTIVES

De nombreux biomarqueurs, notamment IHC, ont été mis en évidence au fil des ans dans le but d'identifier les DLBCL de moins bon pronostic. Certains sont utilisés en routine, comme *BCL-2*, *BCL-6* et *MYC* (par certaines équipes), bien que leur valeur pronostique soit soumise à controverse. Beaucoup d'autres comme *P53*, *HIF-1*, *LMO2* (Natkunam, Y.<sup>94</sup>), *FOXP1* (Barans, S. L.<sup>15</sup>), *HSP70* (Magangane, P.<sup>95</sup>), *EZH2* (Guo, S.<sup>96</sup>), *CD37* (Xu-Monette, ZY.<sup>97</sup>)... ne sont pas utilisés. Au-delà du fait que ces marqueurs soient uniquement pronostiques et non théranostiques, un grand nombre d'études ont été réalisées avec des résultats parfois contradictoires. Comme, chaque équipe propose un cut-off optimisé différent, les résultats apparaissent difficilement comparables et reproductibles d'une étude à l'autre. De plus, l'arrivée du Rituximab a modifié les impacts pronostiques de certains marqueurs.

En ce qui concerne la réalisation de la technique IHC, chaque clone d'anticorps possède une notice délivrée par le fournisseur indiquant les conditions de réalisation du marquage, notamment la dilution et le pH de la solution de démasquage. Chaque laboratoire a cependant la capacité de réaliser des ajustements en fonction des résultats observés sur des témoins positifs et négatifs. Ainsi, l'hétérogénéité des techniques IHC et de leur interprétation explique probablement pourquoi ces biomarqueurs ne sont pas rentrés dans la pratique courante. Il est envisageable que notre biomarqueur subisse le même sort. Cependant, une analyse en cours montre une association entre l'expression de l'ARNm de la *GAPDH* et son expression protéique. Puisqu'il semble que les techniques d'analyse transcriptomique comme le nanostring ou la RT-MLPA se démocratisent dans les années à venir, une des solutions serait d'intégrer la *GAPDH* à cette analyse. Cependant, ces méthodes connaissent également leurs limites. En effet, la proportion de cellules tumorales extraites n'est jamais de 100%. L'analyse est souvent « contaminée » par d'autres cellules comme les petits lymphocytes B et T réactionnels. Une bonne validation pré-analytique sera indispensable à l'interprétation des résultats. L'ultime solution serait de trier les cellules tumorales par cytométrie de flux avant l'analyse, ce qui nécessiterait des prélèvements à l'état frais ou congelés et d'énormes moyens techniques et financiers.

En ce qui concerne l'interprétation du marquage IHC de CD20, habituellement, elle est réalisée de manière qualitative afin d'identifier les populations lymphoïdes B, c'est-à-dire que l'on cherche uniquement à vérifier sa positivité ou négativité. Néanmoins, au cours de ce travail, nous avons observé un différentiel d'expression d'intensité du CD20 au niveau des cellules tumorales. Ainsi, de manière assez novatrice, nous avons réalisé la quantification de CD20 dans les cellules tumorales des DLBCL. La question légitime que l'on peut se poser est : pourquoi alors faire le marquage *GAPDH* alors que l'on a déjà le CD20. L'interprétation du marquage IHC de CD20 est plus difficile et sujette à controverse. En effet, l'anticorps utilisé en IHC détecte un épitope intracytoplasmique du CD20 ce qui n'est pas forcément le reflet de son expression à la surface et il a été montré que certains DLBCL positif pour le CD20 en IHC en exprimaient peu à leur surface en cytométrie de flux. Par ailleurs,

l'intensité du marquage est globalement plus forte que celle de la GAPDH et le différentiel d'expression est moins grand qu'avec la GAPDH. La discrimination entre les forts « expresseurs » et les faibles est donc moins aisée. Par ailleurs, certains laboratoires privilégient la sensibilité en augmentant la concentration de l'anticorps anti-CD20 (utilisation de Linker) ce qui entraîne une absence de différentiel d'expression.

Nos observations ont été réalisées sur des DLBCL au diagnostic. Au cours d'un traitement au R-CHOP, il peut s'établir une résistance au traitement, parfois caractérisée par une diminution de l'expression de CD20 (Hiraga, J.<sup>98</sup>). Peut-on établir une corrélation entre les lymphomes réfractaires au R-CHOP et l'expression de GAPDH et CD20 ?

Dans le cadre de mes activités de recherche au sein de l'équipe du Dr Ricci, nous avons étudié un modèle de lymphome folliculaire humain rendu résistant *in vivo* chez des souris immunodéficientes traitées au Rituximab, travail réalisé en collaboration avec le Pr Dumontet (Centre de recherche en cancérologie de Lyon). Les tumeurs au phénotype résistant (RLRR) présentaient des niveaux d'expression de CD20 inférieurs à ceux des tumeurs au phénotype sensible (RLRS) (étudiés en IHC, en cytométrie de flux et par western blot) mais également moins de GAPDH alors qu'il n'y a pas de différence significative avec les autres enzymes de la glycolyse.

Il serait intéressant de vérifier si ce phénotype (résistance = moins de GAPDH = moins de CD20) apparaît sur des biopsies de patients à la rechute et le comparer aux biopsies au diagnostic pour vérifier le lien entre GAPDH et CD20 et pour voir si le patient a acquis une résistance au Rituximab ou s'il avait déjà ce phénotype au diagnostic. Pour cela, nous avons obtenu des TMA de l'étude Bio-CORAL (Thieblemont, C.<sup>23</sup>) du LYSA qui regroupent des biopsies de 87 DLBCL réfractaires ou en rechute réalisées au diagnostic et à la rechute afin de faire le marquage GAPDH. Leur interprétation ainsi que celle de CD20 est en cours.

Les mécanismes reliant l'expression de la GAPDH à celle du CD20 restent inconnus à l'heure actuelle et font l'objet d'un travail de recherche dans le laboratoire du Dr Ricci.

L'identification d'un nouveau marqueur pronostique présente un intérêt limité s'il ne permet pas d'orienter la prise en charge des patients réfractaires vers une nouvelle thérapeutique. Les DGL présentant une mauvaise réponse au R-CHOP, il est impératif de proposer à ces patients une alternative ou un traitement complémentaire dès le diagnostic.

Par analyses transcriptomiques, des signatures moléculaires en rapport avec le métabolisme énergétique des DLBCL ont été mises en évidence (Caro, P.<sup>11</sup>). La GAPDH étant une enzyme clé de la glycolyse, nous nous sommes demandé si son expression pouvait représenter un potentiel marqueur de l'état métabolique des tumeurs ( $DGH = \text{métabolisme glycolytique} / DGL = \text{métabolisme mitochondrial}$ ). À partir d'un modèle murin spontané de lymphomes B et de biopsies « fraîches » de patients prélevés à l'Hôpital St Louis à Paris, au Centre Antoine Lacassagne à Nice et au Centre Hospitalier Princesse Grâce de Monaco, le Dr Chiche a démontré que les DLBCL qui expriment peu de GAPDH (R-CHOP non-répondeur) produisent leur énergie par la mitochondrie, tandis que les DLBCL qui expriment fortement la GAPDH (R-CHOP répondeur) utilisent la glycolyse. Par conséquent les DGL, non-répondeur au R-CHOP pourraient bénéficier d'une stratégie thérapeutique ciblant le métabolisme mitochondrial afin d'effondrer leur production énergétique. Dans ce cadre, le Professeur Thieblemont C. a proposé un protocole compassionnel thérapeutique innovant ciblant le métabolisme mitochondrial des DLBCL réfractaires au R-CHOP et aux traitements conventionnels. Cette stratégie thérapeutique combine la L-asparaginase, un inhibiteur de mTOR, de la metformine et du Rituximab. Nous avons pu réaliser un marquage IHC GAPDH sur les biopsies au diagnostic de ces patients. Parmi les 9 patients de l'essai, 7 étaient des DGL, confirmant le caractère prédictif de la GAPDH. Sur les 5 patients ayant reçu le traitement complet, 4 étaient DGL dont 3 ont présenté une rémission complète après 2 cycles de traitement. L'ensemble des patients a malheureusement rechuté à 6 mois. Cet essai thérapeutique ouvre des perspectives importantes pour les DLBCL de mauvais

pronostic et apparait comme une preuve préliminaire que la GAPDH peut-être un marqueur compagnon d'une nouvelle stratégie thérapeutique ciblant le métabolisme mitochondrial.

Ainsi, nous avons mis en évidence un marqueur prédictif de la réponse au traitement par R-CHOP des DLBCL et ce dès le diagnostic. L'analyse de l'expression de la GAPDH en IHC est rapide, facile d'utilisation, peu coûteuse et réalisable en pratique courante. Elle permet d'identifier les patients DGL potentiellement réfractaires au traitement conventionnel mais qui pourraient bénéficier d'un traitement ciblant spécifiquement le métabolisme oxydatif.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. [www.lysarc.org/les-lymphomes/](http://www.lysarc.org/les-lymphomes/).
2. Brousse N. et Bruneau J. *Pathologie Lymphoïde : Les lymphomes et leurs diagnostics différentiels*. (2014).
3. Lymphome non hodgkinien : points clés - Lymphome non hodgkinien | Institut National Du Cancer. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Lymphome-non-hodgkinien/Points-cles>. (Accessed: 23rd May 2017)
4. Alizadeh, A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503–511 (2000).
5. Wright, G. *et al.* A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9991–9996 (2003).
6. Lenz, G. *et al.* Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2313–2323 (2008).
7. Hans, C. P. *et al.* Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **103**, 275–282 (2004).
8. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–2390 (2016).
9. Gutiérrez-García, G. *et al.* Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* **117**, 4836–4843 (2011).
10. Monti, S. *et al.* Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* **105**, 1851–1861 (2005).

11. Caro, P. *et al.* Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* **22**, 547–560 (2012).
12. Scott, D. W. & Gascoyne, R. D. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 517–534 (2014).
13. Swerdlow, S. H. in *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* 233–237 (2008).
14. Falini, B. *et al.* A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* **95**, 2084–2092 (2000).
15. Barrans, S. L., Fenton, J. A. L., Banham, A., Owen, R. G. & Jack, A. S. Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome. *Blood* **104**, 2933–2935 (2004).
16. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **329**, 987–994 (1993).
17. Ziepert, M. *et al.* Standard International Prognostic Index Remains a Valid Predictor of Outcome for Patients With Aggressive CD20+ B-Cell Lymphoma in the Rituximab Era. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2373–2380 (2010).
18. Coiffier, B. *et al.* Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* **116**, 2040–2045 (2010).
19. Casasnovas, R.-O. *et al.* SUVmax reduction improves early prognosis value of interim positron emission tomography scans in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **118**, 37–43 (2011).

20. Xie, M., Wu, K., Liu, Y., Jiang, Q. & Xie, Y. Predictive value of F-18 FDG PET/CT quantization parameters in diffuse large B cell lymphoma: a meta-analysis with 702 participants. *Med. Oncol.* **32**, 1–10 (2014).
21. Boellaard, R. Standards for PET Image Acquisition and Quantitative Data Analysis. *J. Nucl. Med.* **50**, 11S–20S (2009).
22. Horn, H. *et al.* MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **121**, 2253–2263 (2013).
23. Thieblemont, C. *et al.* The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 4079–4087 (2011).
24. Copie-Bergman, C. *et al.* MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* **126**, 2466–2474 (2015).
25. Johnson, N. A. *et al.* Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 3452–3459 (2012).
26. Karube, K. & Campo, E. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin. Hematol.* **52**, 97–106 (2015).
27. Petrella, T. *et al.* BCL2 expression but not MYC and BCL2 coexpression predicts survival in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma independently of cell of origin in the phase 3 LNH03-6B trial. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* (2017).  
doi:10.1093/annonc/mdx022

28. Hermine, O. *et al.* Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* **87**, 265–272 (1996).
29. Hill, M. E. *et al.* Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* **88**, 1046–1051 (1996).
30. Gascoyne, R. D. *et al.* Prognostic Significance of Bcl-2 Protein Expression and Bcl-2 Gene Rearrangement in Diffuse Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* **90**, 244–251 (1997).
31. Lossos, I. S. *et al.* Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **98**, 945–951 (2001).
32. Allman, D. *et al.* BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* **87**, 5257–5268 (1996).
33. Evens, A. M. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 {alpha} expression predicts superior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 1017–1024 (2010).
34. Evens, A. M. *et al.* Hypoxia-Inducible Factor-Alpha Activation in Lymphoma and Relationship to the Thioredoxin Family. *Br. J. Haematol.* **141**, 676–680 (2008).
35. Bhalla, S., Evens, A. M., Prachand, S., Schumacker, P. T. & Gordon, L. I. Paradoxical Regulation of Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) by Histone Deacetylase Inhibitor in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *PLoS ONE* **8**, e81333 (2013).
36. Ichikawa, A. *et al.* Mutations of the p53 Gene as a Prognostic Factor in Aggressive B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **337**, 529–534 (1997).
37. Kramer, M. H. *et al.* Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **14**, 2131–2138 (1996).

38. Koduru, P. R. K. *et al.* Correlation Between Mutation in P53, p53 Expression, Cytogenetics, Histologic Type, and Survival in Patients With B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* **90**, 4078–4091 (1997).
39. Copie-Bergman, C. *et al.* Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: a GELA study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 5573–5579 (2009).
40. Nyman, H., Jerkeman, M., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Banham, A. H. & Leppä, S. Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **22**, 1094–1101 (2009).
41. Staiger, A. M. *et al.* Clinical Impact of the Cell-of-Origin Classification and the MYC/BCL2 Dual Expresser Status in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated Within Prospective Clinical Trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* JCO2016703660 (2017). doi:10.1200/JCO.2016.70.3660
42. Coiffier, B. *et al.* CHOP Chemotherapy plus Rituximab Compared with CHOP Alone in Elderly Patients with Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **346**, 235–242 (2002).
43. Boross, P. & Leusen, J. H. W. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am. J. Cancer Res.* **2**, 676–690 (2012).
44. Johnson, N. A. *et al.* Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood* **113**, 3773–3780 (2009).
45. Tsai, P.-C., Hernandez-Ilizaliturri, F. J., Bangia, N., Olejniczak, S. H. & Czuczman, M. S. Regulation of CD20 in Rituximab-Resistant Cell Lines and B-cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1039–1050 (2012).

46. GA In NEwly Diagnosed Diffuse Large B Cell Lymphoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01659099>. (Accessed: 26th May 2017)
47. Hernandez-Ilizaliturri, F. J. *et al.* Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype. *Cancer* **117**, 5058–5066 (2011).
48. Search of: DLBCL lenalidomide - List Results - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=DLBCL+lenalidomide&Search=Search>. (Accessed: 26th May 2017)
49. Younes, A. *et al.* Combination of ibrutinib with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) for treatment-naive patients with CD20-positive B-cell non-Hodgkin lymphoma: a non-randomised, phase 1b study. *Lancet Oncol.* **15**, 1019–1026 (2014).
50. Wilson, W. H. *et al.* Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Med.* **21**, 922–926 (2015).
51. Search of: DLBCL ibrutinib - List Results - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=DLBCL+ibrutinib&Search=Search>. (Accessed: 26th May 2017)
52. Colell, A., Green, D. R. & Ricci, J.-E. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ.* **16**, 1573–1581 (2009).
53. Sundararaj, K. P. *et al.* Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **279**, 6152–6162 (2004).

54. Zheng, L., Roeder, R. G. & Luo, Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* **114**, 255–266 (2003).
55. Harada, N. *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 22651–22661 (2007).
56. Andrade, J., Pearce, S. T., Zhao, H. & Barroso, M. Interactions among p22, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and microtubules. *Biochem. J.* **384**, 327–336 (2004).
57. Tisdale, E. J., Kelly, C. & Artalejo, C. R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with Rab2 and plays an essential role in endoplasmic reticulum to Golgi transport exclusive of its glycolytic activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 54046–54052 (2004).
58. Raje, C. I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J. S. & Raje, M. The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. *J. Biol. Chem.* **282**, 3252–3261 (2007).
59. Azam, S. *et al.* Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase plays a direct role in reactivating oxidized forms of the DNA repair enzyme APE1. *J. Biol. Chem.* **283**, 30632–30641 (2008).
60. Lee, M. N. *et al.* Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3991–4001 (2009).
61. Tarze, A. *et al.* GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* **26**, 2606–2620 (2007).
62. Hara, M. R. *et al.* S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.* **7**, 665–674 (2005).
63. Colell, A. *et al.* GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* **129**, 983–997 (2007).

64. Carujo, S. *et al.* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a SET-binding protein and regulates cyclin B-cdk1 activity. *Oncogene* **25**, 4033–4042 (2006).
65. Révillion, F., Pawlowski, V., Hornez, L. & Peyrat, J. P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **36**, 1038–1042 (2000).
66. Schek, N., Hall, B. L. & Finn, O. J. Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* **48**, 6354–6359 (1988).
67. Alexander-Bridges, M. *et al.* Multiple insulin-responsive elements regulate transcription of the GAPDH gene. *Adv. Enzyme Regul.* **32**, 149–159 (1992).
68. Jacquin, M. A. *et al.* GAPDH binds to active Akt, leading to Bcl-xL increase and escape from caspase-independent cell death. *Cell Death Differ.* **20**, 1043–1054 (2013).
69. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261–1274 (2007).
70. Chen, R. W. *et al.* Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **19**, 9654–9662 (1999).
71. Bereta, J. & Bereta, M. Stimulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels by endogenous nitric oxide in cytokine-activated endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 363–369 (1995).
72. Tisdale, E. J. & Artalejo, C. R. A GAPDH mutant defective in Src-dependent tyrosine phosphorylation impedes Rab2-mediated events. *Traffic Cph. Den.* **8**, 733–741 (2007).
73. Kawamoto, R. M. & Caswell, A. H. Autophosphorylation of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes. *Biochemistry (Mosc.)* **25**, 656–661 (1986).

74. Laschet, J. J. *et al.* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is a GABAA Receptor Kinase Linking Glycolysis to Neuronal Inhibition. *J. Neurosci.* **24**, 7614–7622 (2004).
75. Brown, V. M. *et al.* A Novel CRM1-mediated Nuclear Export Signal Governs Nuclear Accumulation of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase following Genotoxic Stress. *J. Biol. Chem.* **279**, 5984–5992 (2004).
76. Kodama, R. *et al.* Nuclear localization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is not involved in the initiation of apoptosis induced by 1-Methyl-4-phenyl-pyridium iodide (MPP+). *Genes Cells* **10**, 1211–1219 (2005).
77. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270 (1956).
78. Kim, J. & Dang, C. V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 142–150 (2005).
79. Wang, Q., Vaupel, P., Ziegler, S. I. & Shi, K. Exploring the quantitative relationship between metabolism and enzymatic phenotype by physiological modeling of glucose metabolism and lactate oxidation in solid tumors. *Phys. Med. Biol.* **60**, 2547 (2015).
80. Lucarelli, G. *et al.* Metabolomic profile of glycolysis and the pentose phosphate pathway identifies the central role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in clear cell-renal cell carcinoma. *Oncotarget* **6**, 13371–13386 (2015).
81. Zhu, X. *et al.* ENO1 promotes tumor proliferation and cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in Non-Hodgkin's Lymphomas. *Exp. Cell Res.* **335**, 216–223 (2015).
82. Zhu, D., Qi, C. F., Morse, H. C., Janz, S. & Stevenson, F. K. Deregulated expression of the Myc cellular oncogene drives development of mouse 'Burkitt-like' lymphomas from naive B cells. *Blood* **105**, 2135–2137 (2005).
83. Chiche, J. *et al.* GAPDH enhances the aggressiveness and the vascularization of non-Hodgkin's B lymphomas via NF- $\kappa$ B-dependent induction of HIF-1 $\alpha$ . *Leukemia* (2014). doi:10.1038/leu.2014.324

84. Delarue, R. *et al.* Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **14**, 525–533 (2013).
85. Van Diest, P. J. *et al.* A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Gynaecological Cancer Cooperative Group. *J. Clin. Pathol.* **50**, 801–804 (1997).
86. McCarty, K. S., Miller, L. S., Cox, E. B., Konrath, J. & McCarty, K. S. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **109**, 716–721 (1985).
87. Kaye, P. V. *et al.* Novel staining pattern of p53 in Barrett's dysplasia – the absent pattern. *Histopathology* **57**, 933–935 (2010).
88. Singh, V. *et al.* Surface levels of CD20 determine anti-CD20 antibodies mediated cell death in vitro. *PloS One* **9**, e111113 (2014).
89. Golay, J. *et al.* CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* **98**, 3383–3389 (2001).
90. Maurer, M. J. *et al.* Event-Free Survival at 24 Months Is a Robust End Point for Disease-Related Outcome in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Immunochemotherapy. Available at: <http://jco.ascopubs.org>. (Accessed: 29th July 2015)
91. Perry, A. M. *et al.* MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br. J. Haematol.* **165**, 382–391 (2014).
92. Mareschal, S. *et al.* Accurate Classification of Germinal Center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and Rapid Reverse

- Transcriptase–Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay: A CALYM Study. *J. Mol. Diagn.* **17**, 273–283 (2015).
93. Nyman, H. *et al.* Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood* **109**, 4930–4935 (2007).
94. Natkunam, Y. *et al.* LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26**, 447–454 (2008).
95. Magangane, P., Sookhayi, R., Govender, D. & Naidoo, R. Determining protein biomarkers for DLBCL using FFPE tissues from HIV negative and HIV positive patients. *J. Mol. Histol.* **47**, 565–577 (2016).
96. Guo, S. *et al.* Clinicopathological features of primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system - strong EZH2 expression implying diagnostic and therapeutic implication. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **124**, 1054–1062 (2016).
97. Xu-Monette, Z. Y. *et al.* Assessment of CD37 B-cell antigen and cell of origin significantly improves risk prediction in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **128**, 3083–3100 (2016).
98. Hiraga, J. *et al.* Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood* **113**, 4885–4893 (2009).

## ANNEXES

## Annexe 1 : ARTICLE ORIGINAL EN COURS DE RÉVISION À NATURE MEDICINE

**Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression predicts the response of B lymphoma patients to metabolic inhibitors**

Johanna Chiche<sup>1,2</sup>, Julie Reverso-Meinietti<sup>1,2,3</sup>, Annabelle Mouchotte<sup>1,2</sup>, Elodie Villa<sup>1,2</sup>, Emma Proics<sup>1,2</sup>, Agnès Paquet<sup>2,4</sup>, Konstantina Fragaki<sup>2,5,6</sup>, Sandrine Marchetti<sup>2,7</sup>, Josette Briere<sup>8</sup>, Damien Ambrosetti<sup>3</sup>, Jean-François Michiels<sup>2,3</sup>, Thierry Jo Molina<sup>9</sup>, Isabelle Peyrottes<sup>10</sup>, Frederic Peyrade<sup>10</sup>, Eric De Kerviler<sup>11</sup>, Bruno Taillan<sup>12</sup>, Georges Garnier<sup>12</sup>, Els Verhoeyen<sup>1,2</sup>, Véronique Paquis-Flucklinger<sup>2,5,6</sup>, Laetitia Shintu<sup>13</sup>, Vincent Delwail<sup>14</sup>, Celine Debais<sup>15</sup>, Richard Delarue<sup>16</sup>, André Bosly<sup>17</sup>, Tony Petrella<sup>18</sup>, Pascal Barbry<sup>2,4</sup>, Nicolas Mounier<sup>19</sup>, Catherine Thieblemont<sup>8</sup> and Jean-Ehrland Ricci<sup>1,2,\*</sup>

1: Inserm, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), équipe 3 "Metabolism, cancer and immune response", Nice, France

2: Université Côte d'Azur, Nice, France

3: Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Département d'anatomo-pathologie, Nice, France, Laboratoire Central d'Anatomocytologie (LCAP), CHU de Nice

4: Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 06560 Sophia Antipolis, France

5: IRCAN, UMR CNRS 7284/INSERM U1081/UNS, School of Medicine, Nice Sophia-Antipolis University, France

6: Department of Medical Genetics, National Centre for Mitochondrial Diseases, Nice Teaching Hospital, France

7: Inserm, U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), équipe "mort cellulaire, différenciation, inflammation et cancer", Nice, France

8: AP-HP-Hôpital Saint-Louis, Service d'hémo-Oncologie, EA 7324, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75010 Paris, France

9: Département de Pathologie, Hôpital Necker, AP-HP, EA 7324, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

10: Centre Antoine-Lacassagne, Nice, France

11: APHP, Hopital Saint-Louis. Service de Radiologie, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75010 Paris, France

12: Centre Hospitalier Princesse Grace de Monaco, Monaco

13: Aix Marseille Univ, CNRS, Centrale Marseille, Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (ISM2), Marseille, France

14: Department of Oncology-Hematology and Cell Therapy, University Hospital, CIC INSERM 1402, Poitiers, France

15: Department of Pathology, CHU/Université de Poitiers, Poitiers, France

16: Department of Hematology, AP-HP Hôpital Necker, Paris, France.

17: CHU Dinant Godinne, Ucl Namur, Yvoir, Belgium.

18: Department of Pathology, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Quebec, Canada.

19: Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Département d'Onco-Hématologie, Nice, France

\* corresponding author:

Jean-Ehrland Ricci PhD, Inserm U1065, équipe 3

151 route de St Antoine de Ginestière,

BP 23194, 06204 Nice Cedex 03, France.

• Phone: +33 4 89 06 43 04; Fax +33 4 89 06 42 21

• email: [ricci@unice.fr](mailto:ricci@unice.fr)

## Annexe 2 : FICHE DE NON-OPPOSITION DES PATIENTS

**Utilisation et conservation d'échantillons biologiques à des fins de recherche**

À l'attention des patients

Madame, Monsieur,

Merci de lire attentivement ces informations.

Vous êtes suivi par votre hématologue. Dans le cadre de la prise en charge de votre pathologie au Centre Hospitalier Universitaire du CHU de Nice (CHU de Nice), une exérèse ou une biopsie ganglionnaire (prélèvement d'un petit fragment de ganglion) a été nécessaire pour poser le diagnostic de votre affection. Seule une partie de ce prélèvement est nécessaire pour établir le diagnostic. Le reste de ce prélèvement est archivé (sous forme de blocs en paraffine et/ou congelé à -80°C) dans les locaux du Laboratoire Central d'Anatomie et de cytologie Pathologiques du CHU de Nice.

Dans le but d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques associés à la recherche de nouvelles thérapeutiques, nous souhaiterions pouvoir utiliser une partie de ce prélèvement archivé à des fins de recherche.

**Ces recherches sont placées sous la responsabilité du Pr. Nicolas Mounier du Service d'Onco-Hématologie et du laboratoire INSERM U1065, Equipe 3 dirigée par Jean-Ehrland RICCI. L'objectif de ces recherches est d'apporter dans un avenir proche des perspectives thérapeutiques nouvelles.**

Si vous ne vous opposez pas à la conservation et à l'utilisation de vos échantillons, ces derniers pourront être utilisés pour cette recherche.

Le CHU de Nice informera les autorités de tutelle de l'utilisation de ces échantillons à des fins de recherche.

En cas de retrait ultérieur de votre non-opposition, les prélèvements et données s'y affairant ne seront pas utilisés pour cette recherche.

**Sans réponse de votre part dans les 30 jours à compter de la réception de ce courrier, nous considérerons que vous ne vous opposez pas à l'utilisation de vos échantillons à des fins de recherche.**

**Pourquoi des échantillons biologiques humains sont utilisés pour faire de la recherche ?**

Il existe encore de nombreuses maladies qui sont mal connues, pour lesquelles il n'y a pas de traitement efficace ou dont le diagnostic est difficile. Pour permettre des avancées dans chaque domaine thérapeutique, il est indispensable que des recherches soient effectuées sur des échantillons biologiques issus de patients atteints de la pathologie concernée, ou parfois sur des échantillons de patients sains.

**Pouvez-vous vous opposer à l'utilisation de vos échantillons biologiques à des fins de recherche ?**

**OUI.**

Vos échantillons biologiques ne sont pas la propriété du CHU de Nice. Vous pouvez vous opposer à leur utilisation à des fins de recherche. Ils seront alors conservés essentiellement pour une utilisation ultérieure dans le cadre de votre prise en charge. Après le délai réglementaire de conservation dépendant la nature des échantillons, ils seront détruits.

Si aujourd'hui vous ne vous opposez pas à leur utilisation, vous pouvez à tout moment revenir sur votre décision en vous adressant au médecin qui vous suit ou vous a suivi au CHU de Nice.

### **Peut-on utiliser vos échantillons biologiques pour toutes les recherches ?**

**NON.**

Aucun examen de vos caractéristiques génétiques constitutionnelles ne sera réalisé sans votre consentement écrit.

Toute mise en place d'une recherche biomédicale à partir de vos échantillons biologiques fera l'objet d'une demande d'avis auprès du Comité de Protection des Personnes (CPP) et vous pourrez être informé de cet avis si vous le souhaitez.

### **Existe-t-il une réglementation encadrant l'utilisation de vos échantillons ?**

**OUI.**

Le CHU de Nice a l'obligation de déclarer la conservation de vos échantillons à des fins de recherche au Ministère de la Recherche, au Comité de Protection des Personnes et à l'Agence Régionale de l'Hospitalisation. (Décret n°2007-1220 du 10 août 2007)

**Dans le cadre de la recherche à laquelle le Pr. Mounier** vous propose de participer un traitement informatisé de vos données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche. Ces données seront anonymisées et traitées en conformité avec la Loi Informatique et Libertés n°78-17 du 6 janvier 1978. Conformément aux dispositions de la loi relatives à l'informatique aux fichiers et aux libertés vous disposez d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition.

Pour toute question, votre médecin du CHU de Nice, le Pr Mounier, pourra vous renseigner.

#### **À remplir par le patient**

Nom:

Prénom :

Je m'oppose à l'utilisation de mes échantillons biologiques à des fins de recherche

## Annexe 3 : INDEX PRONOSTIQUE DES DLBCL

## Facteurs pronostiques de survie selon l'IPI (Index Pronostique International)

## A. Index Pronostique International

Âge ( $\leq 60$  ans vs  $> 60$  ans)LDH ( $\leq$  normale vs  $>$  normale)

Index OMS (0-1 vs 2-4)

Stade Ann Arbor (I/II vs III/IV)

Nombre de sites extraganglionnaires ( $\leq 1$  site vs  $> 1$ )B. Index Pronostique International ajusté à l'âge (aa IPI) [ $\leq 60$  ans]

Stade Ann Arbor (I/II vs III/IV)

LDH ( $\leq$  normale vs  $>$  normale)

Index OMS (0-1 vs 2-4)

## Survie selon l'Index Pronostique International et l'aaIPI (IPI ajusté à l'âge)

	Facteurs de risque	Distribution (%)	Survie globale à 5 ans (%) <sup>*</sup>
<b>A. Index international</b>			
Faible	0 - 1	35	73
Faible - Intermédiaire	2	27	51
Élevé - Intermédiaire	3	22	43
Élevé	4 - 5	16	26
<b>B. aaIPI (<math>\leq 60</math> ans)</b>			
Faible	0	22	83
Faible - Intermédiaire	1	32	69
Élevé - Intermédiaire	2	32	46
Élevé	3	14	32
<b>B. aaIPI (<math>&gt; 60</math> ans)</b>			
Faible	0	18	56
Faible - Intermédiaire	1	31	44
Élevé - Intermédiaire	2	35	37
Élevé	3	16	21

\* Pourcentages mentionnés à titre indicatif : les patients ont été traités par chimiothérapie avec anthracycline sans anticorps. Ces pourcentages ne correspondent donc pas aux survies actuellement observées.

The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factor Project. N Engl J Med 1993;329:987.

## Survie selon l'Index Pronostique International révisé (R-IPI) proposé pour les malades atteints de lymphome B diffus à grandes cellules traités par CHOP + anticorps

Groupe de risque	Nombre de facteurs pronostiques <sup>*</sup>	Distribution des patients (%)	Survie sans progression à 4 ans (%)	Survie globale à 4 ans (%)
Faible	0	10	94	94
Intermédiaire	1 - 2	45	80	79
Élevé	3 - 5	45	53	55

\* Les facteurs pronostiques sont les mêmes que ceux de l'Index Pronostique International (1993).

Sehn L. et al. Blood 2007;109:1857.

## Annexe 4 : CLASSIFICATION ANN ARBOR

**Stage I** : single lymph node region (I) or single extralymphatic organ or site (I<sub>E</sub>)

**Stage II** :  $\geq 2$  lymph node regions on same side of diaphragm (II) or with limited, contiguous extra lymphatic tissue involvement (II<sub>E</sub>)

**Stage III** : both sides of diaphragm involved, may include spleen (III<sub>S</sub>) or local tissue involvement (III<sub>E</sub>)

**Stage IV** : multiple/disseminated foci involved with  $\geq 1$  extralymphatic organs (i.e. bone marrow)  
(A) or (B) designates absence/presence of "B" symptoms

## Annexe 5 : ECOG PERFORMANCE STATUS / INDEX OMS

ECOG	Description
0	Fully active, able to carry on all pre-disease performance without restriction.
1	Restricted in physically strenuous activity but ambulatory and able to carry out work of a light or sedentary nature, e.g., light house work, office work.
2	Ambulatory and capable of all selfcare but unable to carry out any work activities. Up and about more than 50% of waking hours.
3	Capable of only limited selfcare, confined to bed or chair more than 50% of waking hours.
4	Completely disabled. Cannot carry on selfcare. Totally confined to bed or chair

## TABLE DES MATIÈRES

### LISTE DES PROFESSEURS AU 1<sup>ER</sup> SEPTEMBRE 2016 À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE NICE 4

### REMERCIEMENTS 10

### SOMMAIRE 22

### LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 24

### LISTE DES ANNEXES : 25

### LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ANGLICISMES : 26

### INTRODUCTION 29

<b>A. LES LYMPHOMES B DIFFUS A GRANDES CELLULES (DLBCL)</b>	<b>29</b>
1. ÉPIDÉMIOLOGIE	29
2. BASES PHYSIOPATHOLOGIQUES ET MOLÉCULAIRES (BROUSSE N. ET BRUNEAU J. <sup>2</sup> )	30
a. Oncogènes	30
b. Variants moléculaires	31
3. ÉTIOLOGIE (SWERDLOW, S. H. <sup>13</sup> )	33
4. PRÉSENTATION CLINIQUE (SWERDLOW, S. H. <sup>13</sup> )	33
5. DIAGNOSTIC (SWERDLOW, S. H. <sup>13</sup> )	33
a. Morphologie	34
i. Variant centroblastique	34
ii. Variant immunoblastique	35
iii. Variant anaplasique	35
b. Immunophénotype	35
6. FACTEURS PRONOSTIQUES	36
a. Cliniques	36
b. Paracliniques	37
i. Imagerie	37
ii. Cytogénétique	37
iii. Immunohistochimie	38
iv. Biologie Moléculaire	39
7. PRISE EN CHARGE THÉRAPEUTIQUE	39
a. Molécules de base	40
i. Rituximab	40

ii. Chimiothérapie	41
b. Approche thérapeutique conventionnelle selon le stade	41
i. 1 <sup>ère</sup> ligne	42
Stades localisés (Ann Arbor I-II)	42
Stades étendus (Ann Arbor III-IV)	42
Prophylaxie neuro-méningée	43
Cas particuliers	43
ii. Rechutes / progression	43
iii. Évaluation de l'efficacité et surveillance	43
c. Approche thérapeutique selon la COO	43
<b>B. RÔLE DE LA GAPDH DANS LE CONTEXTE DES LNH</b>	<b>46</b>
1. GAPDH ET GLYCOLYSE	46
2. STRUCTURE	48
3. FONCTIONS NON MÉTABOLIQUES DE LA GAPDH	48
a. Liaison aux acides nucléiques	48
b. GAPDH et télomères	48
c. GAPDH, facteur de transcription	49
d. Interaction avec les autres protéines	49
e. GAPDH senseur de la disponibilité en glucose	49
f. GAPDH et apoptose	49
g. GAPDH, facteur de survie cellulaire	50
4. RÉGULATION	51
5. RÔLE DE LA GAPDH DANS LES LNH	52
a. Rôle de la GAPDH dans la croissance tumorale en l'absence de traitement	52
b. Rationnel GAPDH/DLBCL : vers une nouvelle approche thérapeutique	53
<b>OBJECTIFS</b>	<b>56</b>
<b>MATERIEL ET METHODE</b>	<b>57</b>
<b>A. COHORTE DE DERIVATION</b>	<b>57</b>
<b>B. COHORTE DE VALIDATION</b>	<b>57</b>
<b>C. ETUDE IMMUNOHISTOCHEMIE</b>	<b>58</b>
1. GÉNÉRALITÉS	58
2. INTERPRÉTATION ET QUANTIFICATION	58
3. PROCÉDÉ STANDARD DE COLORATION AUTOMATISÉE	59
4. INTERPRÉTATION DES IHC STANDARDS	60
5. MISE AU POINT DU MARQUAGE IMMUNO-HISTOCHEMIE GAPDH	60
6. INTERPRÉTATION DES MARQUAGES ANTI-GAPDH ET ANTI-CD20 ET ÉTABLISSEMENT D'UN SCORE	61
a. IHC GAPDH	61

b. IHC CD20	62
<b>D. ETUDE STATISTIQUE</b>	<b>62</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>63</b>
<b>A. L'EXPRESSION IHC DE LA GAPDH EST UN MARQUEUR PRÉDICTIF DE LA RÉPONSE AU R-CHOP</b>	<b>63</b>
1. EXPRESSION IHC DE LA GAPDH DANS LES DLBCL AU DIAGNOSTIC	63
2. LA GAPDH EST UN MARQUEUR PRÉDICTIF DE LA RÉPONSE AU R-CHOP	66
<b>B. QUEL MÉCANISME RELIE L'EXPRESSION DE LA GAPDH À LA RÉPONSE THÉRAPEUTIQUE AU R-CHOP :</b>	
<b>APPROCHE ANATOMOPATHOLOGIQUE</b>	<b>68</b>
1. LA GAPDH A UNE VALEUR PRÉDICTIVE INDÉPENDANTE DES AUTRES MARQUEURS PRONOSTIQUES IHC UTILISÉS EN CLINIQUE	68
2. CORRÉLATION ENTRE L'EXPRESSION PROTÉIQUE DE LA GAPDH ET DE CD20	70
<b>DISCUSSION</b>	<b>73</b>
<b>A. PRINCIPAUX RÉSULTATS</b>	<b>73</b>
<b>B. LIMITES</b>	<b>74</b>
<b>C. PERSPECTIVES</b>	<b>76</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>81</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>92</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>97</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	<b>100</b>
<b>SERMENT D'HIPPOCRATE</b>	<b>102</b>

## RÉSUMÉ

Les lymphomes B diffus à grandes cellules ou DLBCL sont les lymphomes les plus fréquents chez l'adulte. En dépit de l'avancée majeure des traitements avec l'immunothérapie (Rituximab, R) qui, associée à la chimiothérapie (CHOP) a augmenté la médiane de survie, 30-40% des patients atteints de DLBCL sont en échec thérapeutique. Il est donc impératif de mettre en évidence un nouveau marqueur permettant d'une part d'identifier au diagnostic les patients susceptibles d'être réfractaires à l'immuno-chimiothérapie (R-CHOP) et d'autre part, de comprendre ces mécanismes de résistance afin d'orienter ces patients vers une nouvelle voie thérapeutique. À partir d'une banque de données transcriptomiques publiques, mon équipe de recherche a mis en évidence 144 gènes capables de prédire la réponse des DLBCL au traitement R-CHOP. Parmi ces gènes figure une seule enzyme du métabolisme glycolytique, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Au diagnostic, les DLBCL qui expriment fortement la *GAPDH* sont associés à une meilleure survie globale que pour ceux l'exprimant faiblement. Cette différence s'observe chez les patients traités par R-CHOP mais pas pour ceux traités par CHOP seul. Les objectifs de mon travail sont : i) démontrer que la GAPDH est un biomarqueur immunohistochimique (IHC) prédictif de la réponse des DLBCL au traitement actuel, le R-CHOP, ii) identifier par une approche anatomopathologique, le(s) mécanisme(s) qui relie(nt) les niveaux de GAPDH à la réponse thérapeutique au R-CHOP. Nous avons examiné l'expression IHC de la GAPDH dans 43 biopsies ganglionnaires prélevées au diagnostic de patients traités par R-CHOP entre 2008 et 2014 au CHU de Nice et à l'Hôpital Saint Louis à Paris. Nous avons réalisé un score d'expression en fonction de l'intensité du marquage et du pourcentage de cellules marquées. Nous avons ensuite déterminé un seuil permettant de classer les DLBCL en GAPDH-High (DGH) ou GAPDH-Low (DGL). Ainsi, nous avons montré que les DGH corrélaient avec une meilleure réponse au R-CHOP. À contrario, les DGL sont associés à un mauvais pronostic. En analyse multivariée, l'expression IHC de la GAPDH est un facteur pronostique indépendant des autres marqueurs pronostiques clinico-biologiques comme l'IP1aa, BCL-2, BCL-6, P53 ou MYC. La

GAPDH apparait comme un facteur prédictif facile d'utilisation, indépendant des autres facteurs pronostiques. Nous avons validé notre seuil et confirmé nos résultats sur les TMA d'une cohorte de validation de 294 patients tirés de l'essai LNH-03-6B du LYSA. De plus, nos résultats montrent une corrélation entre les niveaux d'expression protéiques de GAPDH et de CD20, l'antigène cible du Rituximab. Ces résultats suggèrent que la GAPDH, par l'intermédiaire de la régulation de l'expression de CD20, est un marqueur prédictif de la réponse au R-CHOP. La GAPDH étant une enzyme du métabolisme glycolytique, nous avons également montré qu'elle pouvait prédire l'efficacité d'une stratégie ciblant le métabolisme énergétique de la tumeur. Par conséquent, ce biomarqueur pourrait permettre i) de prédire l'efficacité du traitement actuel (R-CHOP) et ii) d'orienter des patients susceptibles d'être réfractaires au R-CHOP vers une nouvelle alternative thérapeutique.

**SERMENT D'HIPPOCRATE**

En présence des Maîtres de cette École, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'Exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admise dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueuse et reconnaissante envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

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

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.