



**HAL**  
open science

# Le séquençage ‘nouvelle génération’ à haut débit cible ; intérêt dans la prise en charge des lymphomes à cellules du manteau

Arnaud Gauthier

## ► To cite this version:

Arnaud Gauthier. Le séquençage ‘nouvelle génération’ à haut débit cible ; intérêt dans la prise en charge des lymphomes à cellules du manteau. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-02571042

**HAL Id: dumas-02571042**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02571042>**

Submitted on 12 May 2020

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4  
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

**LE SEQUENÇAGE 'NOUVELLE GENERATION' A HAUT DEBIT  
CIBLE ; INTERET DANS LA PRISE EN CHARGE DES LYMPHOMES  
A CELLULES DU MANTEAU**

THÈSE  
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN MÉDECINE  
DIPLOME D'ÉTAT

**Arnaud GAUTHIER**

*[Données à caractère personnel]*

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE

Le : 04/05/2018

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Présidente du jury : Pr Dominique Leroux

Membres

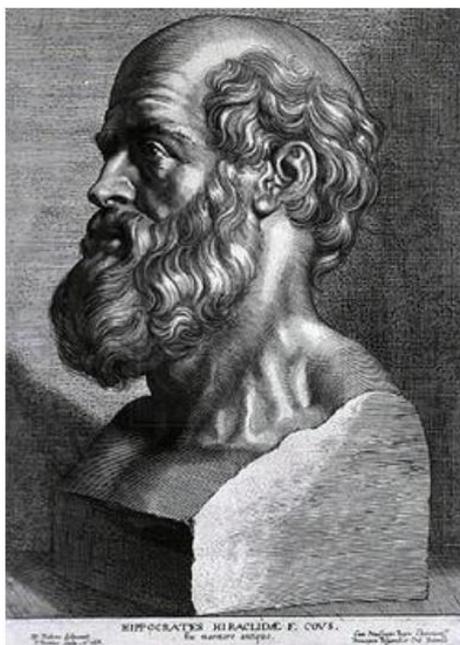
Pr Mary Callanan (directrice de thèse)

Pr Pierre Hainaut

Pr Patrice Morand

Dr Rémy Gressin

*L'UFR de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs*



## Serment d'Hippocrate

En présence des Maîtres de cette Faculté, 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 gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y 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.

Respectueux et reconnaissant 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 couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

## **Remerciement**

En premier lieu, je tiens à remercier mon jury et plus particulièrement ma directrice de thèse, le **Pr Callanan**, pour son savoir transmis, sa gentillesse, son énergie débordante. Merci Mary de m'avoir donné l'opportunité d'aller à Londres faire mon master 2 chez Jude. « *Less is more* », quelle belle philosophie !

Je remercie le **Pr Leroux** pour sa disponibilité et d'avoir accepté d'être la présidente de mon jury, le **Pr Hainaut** de me faire l'honneur de sa présence, et le **Dr Gressin** pour sa simplicité et sa joie de vivre communicative !

Enfin, merci au **Pr Morand** pour ces quelques années à travailler avec vous. Votre porte a toujours été ouverte pour les internes et vous avez su résister à mes venues inopinées au 3<sup>o</sup> étage. Que le travail commencé puisse perdurer !

Je tiens à remercier l'équipe de génétique Onco-hématologique du CHU avec qui j'ai passé de bons moments : **Isabelle** travailleuse acharnée, **Céline** toujours optimiste, **Jean-Jacques** la force tranquille, **Emilie** pour ta bonne humeur, **Lauriane** pour ton humour, **Horia** et **Séverine** mes secrétaires préférées et **Martine** pour ton investissement. De même, merci à l'équipe de recherche de l'IAB, toujours disponible qui a su m'accueillir en son sein, **Sieme**, **Sarah**, **Azadeh** et **Thierry**. Un Merci tout particulier à **Sam** et **Anouk**, vous avez été pour moi d'une précieuse aide, toujours partants, optimistes. Merci pour votre aide et votre écoute !

Je tiens également à remercier les personnes de l'IBP avec qui j'ai aimé discuter et parfois refaire le monde, je pense notamment à **John**, **Xavier** mais aussi au **Pr Cesbron** sans qui mon chemin aurait été sûrement bien différent. Merci à l'équipe de BCB d'être ce qu'elle est. Merci aussi à **Begona** pour sa gentillesse et son dévouement qui se plie toujours en quatre pour les internes.

Ces cinq années furent aussi pour moi l'occasion de participer activement à la vie de l'internat avec une équipe exceptionnelle au service des internes. Je leur tire mon chapeau pour leur investissement sans faille : **Denis** et **Luc**, mes fidèles compagnons, merci pour la Cancun et Polo party, merci pour les crumbles, les cacahuètes, merci pour vos idées et votre présence ; **Louise**, merci de veiller sur l'internat telle une mère ; **Éric**, merci pour ta bienveillance ; **Vincent**, merci pour toute l'énergie que tu donnes pour exaucer nos désirs ; **Xavier** et **Louis**, merci d'être toujours présents ; **Alida, Linda, Maryline, Anthony, Jean-Michel, Kader**, merci de perpétuer la vie à l'internat.

Enfin **Marie-Angèle**, la maman des internes, une énorme Merci à toi ! L'internat ne serait pas ce qu'il est sans toi. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi ces années durant.

Merci aux internes qui ont coloré de joie et folie ces années d'internat. **Akil**, pour m'avoir accueilli chez toi le premier jour et être depuis devenu un véritable ami. **Rémi, Justine, Lulu, Aurélien, Gérald, Giovanni, Liza, Lison, Quentin**, et cie, merci de votre patience avec moi.

Merci les Biololos ! **Benjamin**, que de bons moments passés ensemble, une affiche géante sur l'IBP, un calendrier, des apéros pichet, des ballons, etc.. **Gladou, Soso, Clémentine, Caro, Sinus, VTH, Créno, Clairoudoudou, Rézadoudou, La Truffe, Théo, Charlotte, Despipi, Caro, Lionnel**, et cie, je suis fier d'avoir été l'un de vos co-internes, vous avez participé à redorer l'image de la bio en répondant toujours présent à l'appel. Cependant, sachez garder l'esprit critique face à votre formation, "*demandez et vous recevrez*" !

La bande des BG : **Ben** et **Béran**, merci de n'avoir jamais changé et d'être restés simples ; **Mathieu, Manue, Romain, Virginie, La pluche, Julian, Vincent**, merci d'être aussi naturels !

Merci aux copains d'être toujours là malgré la distance qui nous sépare. Les mots sont bien insuffisants pour décrire mon affection à votre égard. **Geoffroy**, mon compagnon d'expériences ; **Élo**, ma co-auteure ; **Tanguy** et **Choutse**, toujours fidèles au poste ; **Olive** et **Mathieu**, source de tranquillité ; **Paulette** et **Q**, pour vos sourires ; **Chacha**, mon petit pingouin ; **Martin**, ton incroyable simplicité et ta désinvolture ; **Mémé**, pour ton dynamisme et tes convictions ; **Caro**, ma filleule carrément gaulée ; **Doc**, la force tranquille ; **Loïc**, en souvenir de l'ADN, le meilleur journal étudiant.

A mes coloc, **Loulou**, **Sarah** et **Aurel**, merci pour ces années passées à vos côtés. Loulou et son poker ; Sarah et son sourire ; Aurel, les cours rock. Merci à vous !!!

**Nico**, **Marion**, **Camille**, **Aurélien**, **JB**, **Adeline**, **Jordan**, on ne s'est pas vu souvent ces dernières années avec mon internat à Grenoble mais peu importe le temps passé loin de vous, les retrouvailles ont toujours la même saveur. Merci pour cette amitié qui dure et durera.

A ma famille bien aimée, je remercie tout particulièrement mes **Parents** qui m'ont permis de suivre la voie de la médecine en me soutenant à chaque étape. Je les remercie aussi des valeurs qu'ils ont su transmettre à leurs enfants, l'Amour, l'Entraide, le Respect, qui nous habitent aujourd'hui. **Mimi**, ton chemin sinueux qui te caractérise te mènera là où le monde a besoin de toi. **Cloclo**, tu ravies nos papilles par tes chaussons, puisses-tu les diffuser un maximum. **Clem**, ta voie se construit tel un chalet de montagne. **Arthur**, tu vas capturer le monde pour le sublimer à nos yeux.

**Merci à tous ceux qui m'ont accompagnée de près ou de loin dans mes études.**

## Résumé

Le lymphome à cellules du Manteau (MCL), représentant près de 5% de l'ensemble des lymphomes, est celui qui a le plus mauvais pronostic. Sa principale caractéristique est la translocation t(11;14)(q13;q32) conduisant à la surexpression de la protéine cycline D1, impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. D'autres mutations somatiques surviennent ensuite affectant des voies cellulaires primordiales dans la survie, le développement cellulaire, l'adhésion, rendant la pathologie progressivement incontrôlable. L'arrivée des nouvelles techniques de séquençage bouleversent l'approche de la cancérologie et notamment la médecine de précision. Cependant, les algorithmes basés sur le profil moléculaire manquent dans cette pathologie. Pour répondre à ce manque, nous avons étudié en séquençage haut débit une cohorte de 30 patients (38 échantillons) à travers un panel de 44 gènes fréquemment mutés dans le MCL. En étudiant un sous-groupe de patients réfractaires par rapport des patients en rémission à long terme, inscrits dans une étude de phase II du LYSA, RiBVD (Rituximab, Bendamustine, Velcade et Dexaméthasone), nous avons identifiés des mutations dans *TP53*, *MLL2* et *MEF2B* comme caractéristiques de la maladie réfractaire primaire. Le dépistage de la mutation *TP53* par séquençage haut débit ciblé dans 63 autres cas de MCL a montré une courbe survie très courte pour les cas de mutants TP53 par rapport aux cas de type sauvage. Ceci dû à la réduction de la fonction immunitaire cytotoxique et au gain des signatures NFkB et MYC. En somme, notre outil de séquençage ciblé apparaît utile dans la prise en charge diagnostique et pronostique des patients MCL mais aussi potentiellement intéressant pour la découverte de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans cette pathologie.

# Sommaire

<b>Liste des figures</b> .....	9
<b>Partie 1 - Généralité</b> .....	10
1.1    Epidémiologie.....	10
1.2    Classification des syndromes lympho prolifératifs / WHO 2016.....	10
<b>Partie 2 – Pathogénèse des Lymphomes à cellules du manteau</b> .....	12
2.1    Localisation Lymphopoïese B normale ( <i>chronologie</i> ).....	12
2.1.1    Réarrangements somatiques des gènes des Immunoglobulines.....	12
2.1.2    Hypermutation somatique .....	16
2.2    Origine cellulaire / Architecture ganglionnaire .....	17
<b>Partie 3 - Présentation clinico-biologique des MCL</b> .....	21
3.1    Présentation commune.....	22
3.2    Présentation indolente.....	22
3.3    Présentation in situ.....	23
3.4    Diagnostic du lymphome à cellules du manteau .....	23
3.4.1    Hémogramme .....	23
3.4.2    Anatomopathologie .....	23
3.4.3    Cytologie .....	24
3.4.4    Immunophénotypage .....	25
3.4.5    Cytogénétique / Cytogénomique.....	27
3.4.6    Immunogénétique et MRD.....	29
<b>Partie 4 – Paysage mutationnel des MCL</b> .....	33

4.1	Concept de mutation driver et mutation passagère.....	33
4.2	Paysage mutationnel des grandes familles de voies cellulaires touchées.....	34
4.2.1	Methylation de l'ADN .....	41
<b>Partie 5 - Traitement</b> .....		42
5.1	Index Pronostique .....	42
5.2	Les immunochimiothérapies de première ligne.....	43
5.2.1	Patient de moins de 65 ans .....	44
5.2.2	Patient de plus de 65 ans .....	44
5.3	Les immunochimiothérapies de deuxième ligne .....	44
5.3.1	Le Temsirolimus .....	44
5.3.2	L'Ibrutinib .....	44
5.3.3	Le Bortézomib.....	45
<b>Arguments scientifiques</b> .....		46
<b>Résultats</b> .....		49
<b>Bibliographie</b> .....		75

## Liste des figures

Figure 1. Modèle de pathogenèse moléculaire dans le développement des différents sous-types de lymphome à cellules du manteau .....	11
Figure 2. Recombinaison des gènes V-D-J .....	15
Figure 3. Mécanisme d'hypermutation somatique. ....	16
Figure 4. Architecture du ganglion lymphatique .....	18
Figure 5. Représentation schématique de la différenciation des lymphocytes dans le centre germinatif .....	19
Figure 6. Analyse microscopique des différentes formes de lymphome à cellules du manteau. ....	25
Figure 7. Translocation t(11;14) (A) caryotype et B) analyse FISH sonde double fusion) .....	27
Figure 8. Sonde double fusion utilisée en FISH.....	28
Figure 9. Détection d'une translocation t(11,14)(q13q32) par PCR .....	29
Figure 10. WES effectué sur 29 cas et 6 lignées cellulaires dérivées de lymphomes à cellules du manteau (MCL). ....	35
Figure 11. Le séquençage exonique du lymphome à cellules du manteau révèle des gènes mutés de façon récurrente. ....	38
Figure 12. Voies de signalisation affectées dans le lymphome à cellules du manteau .....	40
Figure 13. Modèle épigénétique de la pathogenèse du lymphome à cellules du manteau.....	41
Figure 14. Survie globale pour les risques faibles, intermédiaires et élevé selon le score pronostic MIPI.....	43

## **Partie 1 - Généralité**

L'OMS a élaborée en 2001, puis mis à jour successivement en 2008<sup>1</sup> et en 2016<sup>2</sup> une classification consensus des néoplasies hématopoïétiques et des tissus lymphoïdes. Cette révision se base sur des données cliniques, hématologiques, immunologiques et les découvertes récentes en génétiques pour définir les entités. Le Lymphome à Cellules du Manteau (MCL) qui fait l'objet de notre recherche est classé parmi les lymphomes B non-Hodgkiniens et comprend désormais trois sous-types : Mantle cell lymphoma, leukemic nonnodal mantle cell lymphoma, and in situ mantle cell neoplasia. En effet, ce lymphome à petites cellules de mauvais pronostic fait partie des lymphomes dit agressifs, ce qui n'est pas courant parmi ces néoplasies. Il semble alors pertinent de s'intéresser à sa pathogénèse, à ses caractéristiques ainsi qu'au paysage mutationnel pouvant être à l'origine de cette agressivité ainsi qu'à la base des résistances aux divers traitements mis en œuvre mais auquel les patients finissent inéluctablement par échapper et rechuter.

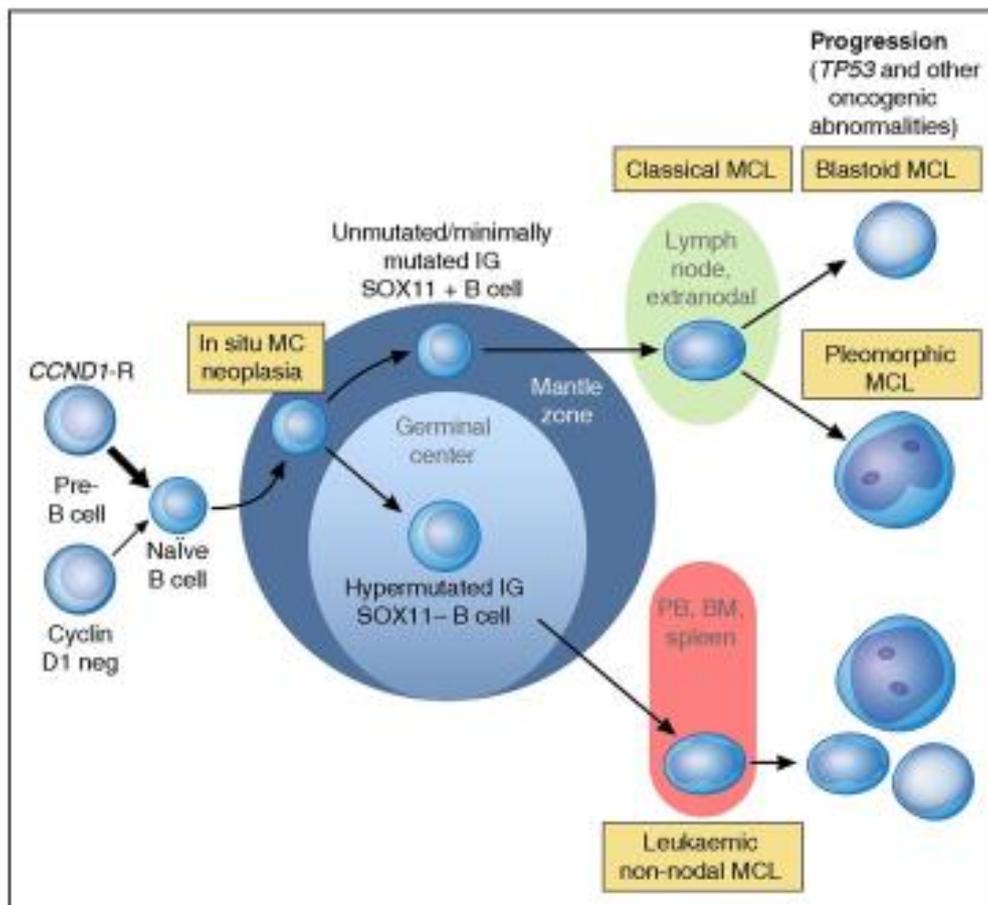
### **1.1 Epidémiologie**

Le lymphome à cellules du manteau est un syndrome lympho-prolifératif de l'adulte de plus de trente ans, avec une médiane vers 65 ans et une nette prédominance masculine (rapport M/F : 3:1)<sup>3</sup>. Il représente environ 5% de tous les lymphomes avec une prévalence estimée à 1/25 000 en France<sup>4</sup>. L'incidence est estimée à moins d'un cas / 100 000 habitants / an. Ce lymphome, qui se développe à partir des cellules de la zone du manteau du ganglion lymphatique, est celui ayant l'un des moins bons pronostics avec une médiane de survie de 5 à 10 ans, avec une amélioration notable ces dernières années avec l'avènement du rituximab.

### **1.2 Classification des syndromes lympho prolifératifs / WHO 2016**

La classification OMS révisée en 2016<sup>2</sup> indique que le lymphome à cellules du manteau (MCL) demeure une pathologie agressive et incurable dérivant de cellules B naïves. Plusieurs entités sont définies telles que le MCL classique, le MCL leucémique extra-ganglionnaire et

enfin la néoplasie du manteau in situ (In situ Mantle Cell Neoplasia). Le MCL classique est composé de cellules B IGHV-non mutées ou faiblement et qui expriment la protéine SOX11. Il se développe au niveau ganglionnaire, avec souvent des atteintes extra-ganglionnaires (tube digestif, localisations ORL...). Il peut évoluer vers des formes dites pleiomorphiques et blastoïdes. La forme leucémique implique des cellules B IGHV-mutées n'exprimant pas SOX11 et dont les principales atteintes sont le sang périphérique, la moelle osseuse et fréquemment la rate. Enfin, la forme *in situ* est une forme de lymphome *a minima* pouvant être assimilée à une forme précurseur, évoluant tôt ou tard, en fonction des mutations génétiques qu'elle acquerra, en l'une ou l'autre des entités précédemment décrites (MCL classique versus MCL leucémique). De par son aspect précurseur et imprévisible, elle est rangée dans les pathologies indolentes. (**Figure 1**)



Steven H. Swerdlow et al. Blood 2016

Figure 1. Modèle de pathogenèse moléculaire dans le développement des différents sous-types de lymphome à cellules du manteau

## **Partie 2 – Pathogénèse des Lymphomes à cellules du manteau**

### **2.1 Localisation Lymphopoïèse B normale (chronologie)**

Au cours de la lymphopoïèse B, les futurs lymphocytes subissent diverses transformations au sein d'une part de la moelle osseuse, la rate puis enfin le ganglion. Ce processus fait évoluer la cellule B immature en cellule B naïve, puis en un lymphocyte spécifique d'un antigène producteur d'anticorps (cellule plasmatique) ou un lymphocyte mémoire. Les trois événements majeurs nécessaires au bon déroulement sont le réarrangement somatique des gènes des immunoglobulines qui se fait dans la moelle osseuse puis des hypermutations somatiques qui se produisent de manière physiologique dans le centre germinatif du ganglion et enfin le processus de co-mutation de classe.

#### **2.1.1 Réarrangements somatiques des gènes des immunoglobulines**

Les lymphocytes B participent à l'immunité humorale en fabriquant des anticorps appelés immunoglobulines. Pour être actifs, leurs anticorps de membrane doivent se lier directement à un antigène exprimé par une cellule présentatrice pour lequel ils sont spécifiques.

La spécificité antigène-anticorps est donnée par le BCR (B-Cell receptor). Ce BCR est issu de la recombinaison des segments de gènes codant les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines et plus spécifiquement de la région VDJ. Le nombre élevé d'antigènes susceptibles d'être rencontrés par l'organisme implique que le génome permette la synthèse d'au moins plusieurs millions de molécules différentes.

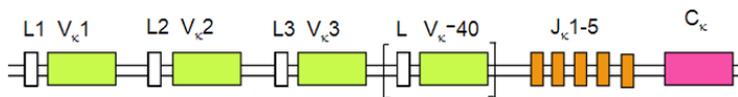
Le locus des gènes des chaînes lourdes (IGH) est situé sur le chromosome 14. Il comprend environ 70 segments regroupés en trois familles de gènes dits de variabilité (V), de diversité (D) et de jonction (J). Neuf gènes codent les régions constantes (C) des 9 classes et sous-classes d'immunoglobulines. Dans l'ordre télomère-centromère, sur le chromosome 14, on trouve les gènes des divers domaines constants des régions C $\mu$ , C $\delta$ , C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 1, C $\epsilon$ 2, C $\alpha$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 4, C $\epsilon$ 1, C $\alpha$ 2. Le gène C $\epsilon$ 2 est un pseudo-gène.

### Locus des chaînes lourdes



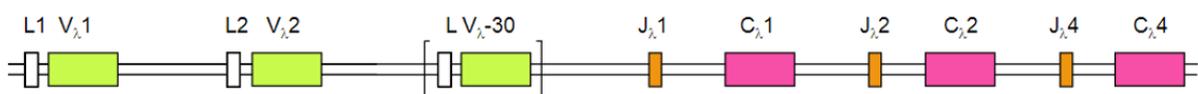
Il y a deux loci pour les gènes des chaînes légères (IGL). Les gènes des chaînes légères  $\kappa$  sont situés sur le chromosome 2. Le locus Igk humain, en configuration germinale, comporte 31 à 35 segments V $\kappa$  fonctionnels ainsi que 5 segments J $\kappa$ . Les segments V $\kappa$  et J $\kappa$  codent la partie variable de la chaîne légère. Un seul segment C $\kappa$  code pour la partie constante.

### Locus des chaînes légères kappa



Les gènes des chaînes légères  $\lambda$  sont situés sur le chromosome 22. Le locus Ig $\lambda$  humain, en configuration germinale, comporte environ 30 segments V $\lambda$  ainsi que 4 segments J $\lambda$ . Il existe au moins six gènes C $\lambda$  différents, chacun étant précédé d'un seul gène J qui lui est propre. La recombinaison se fait au hasard entre l'un des gènes V $\lambda$  et un gène J $\lambda$ .

### Locus des chaînes légères lambda



Deux mécanismes différents assurent la diversité du BCR, respectivement la diversité combinatoire et la diversité jonctionnelle. La diversité combinatoire est gouvernée par le hasard du choix des segments constituant les régions variables. Les régions variables des chaînes lourdes sont obtenues par l'association, dans un premier temps, d'un segment de jonction JH avec un segment de diversité DH, puis le réarrangement de cette association D-JH avec un segment variable VH, le tout aboutissant à la formation d'un exon VDJ (figure). Les régions variables des chaînes légères sont générées seulement par jonction de segments VL et JL pour former un exon VJ. Les régions d'ADN comprises entre les différents segments sont éliminées lors de ces réarrangements sous forme d'un ADN circulaire ou épisode. Les segments géniques codant les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères sont ensuite associés aux exons codant la région constante des chaînes correspondantes. Après

épissage, les ARN messagers matures sont prêts à être traduits en protéines. Le passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des immunoglobulines s'effectue par épissage alternatif d'un même transcrit primaire de chaîne lourde. Le grand nombre de segments V, D et J disponibles et les multiples combinaisons possibles entre ces éléments constituent la base de la diversité combinatoire. La première étape de la recombinaison des gènes d'immunoglobuline repose sur la reconnaissance de séquences d'ADN spécifiques adjacentes aux gènes V, D et J, appelées RSS (séquence signal de recombinaison). Chaque RSS est constituée d'un motif consensuel très conservé de sept nucléotides (heptamère CACAGTG) et d'un autre de neuf nucléotides (nonamère ACAAAAACC). Ces deux motifs sont séparés par une séquence peu conservée de 12 ou 23 nucléotides. Ce type de séquences est présent en 3' des gènes V, en 5' des gènes J et flanke les gènes D. Elles sont complémentaires. Les deux heptamères et les deux nonamères s'associent, ce qui a pour effet de mettre exactement bout à bout les gènes V et J. La ligation des gènes V et J est assurée par des enzymes spécifiques qui reconnaissent ces motifs, les recombinases. La recombinaison ne peut s'effectuer qu'entre RSS possédant un séparateur de taille différente (règle 12/23) permettant d'éviter des réarrangements non désirés. Les recombinasses RAG-1 et RAG-2 sont les seules enzymes lymphoïdes nécessaires à la recombinaison V(D)J. Elles permettent le clivage de la séquence RSS, l'ouverture de la structure en épingle à cheveux et la jonction des segments codants au cours de la recombinaison. L'expression des gènes RAG-1 et RAG-2 est strictement contrôlée lors du développement lymphocytaire B permettant les réarrangements d'abord au niveau du locus IGH, puis au niveau des gènes de chaînes légères. (**Figure 2**)

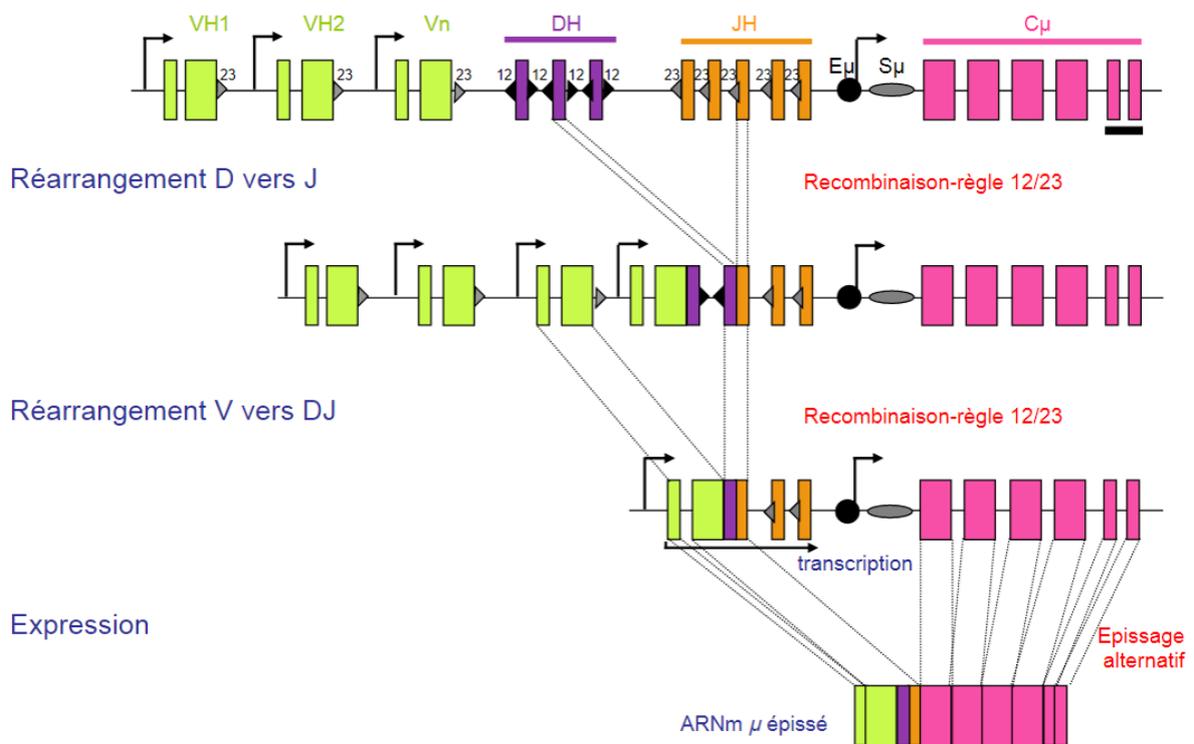


Figure 2. Recombinaison des gènes V-D-J

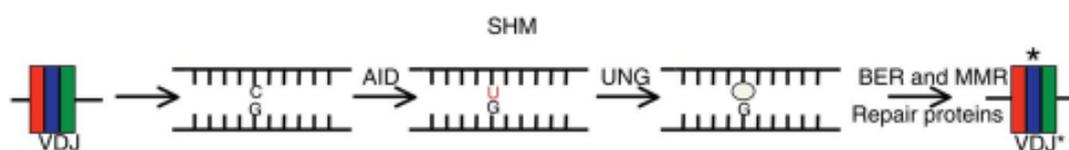
La diversité jonctionnelle permet d'augmenter encore la diversité créée par les mécanismes de recombinaison. Lors des processus de recombinaison V(D)J, les mécanismes de réparation de l'ADN créent une variabilité dans les zones de jonction entre les gènes associés et la position précise à laquelle les segments génétiques V(D)J se joignent peut légèrement varier. Ce phénomène induit un degré supplémentaire de diversité par délétion ou insertion de nucléotides dans les régions variables des immunoglobulines. Au niveau des segments codants on trouve deux types d'insertion nucléotidique:

i) les insertions «non-templated» : jusqu'à 15 nucléotides (N) sont ajoutés au hasard par la terminal déoxynucléotidyl transférase (TdT). Le terme de «non templated» signifie qu'il n'y a pas d'appariement base à base sur un segment d'ADN. Cette insertion est spécifique du stade précoce du développement du lymphocyte B, pendant lequel la TdT est exprimée et où a lieu la recombinaison V(D)J. La TdT ajoute ces nucléotides sans amorçage, avec une préférence pour des résidus G. Ces régions N sont ainsi riches en G-C.

ii) les insertions « templated » : quelques nucléotides sont ajoutés au niveau des joints codants. Ces nucléotides sont appelés P en raison de la structure palindromique des séquences RSS et sont complémentaires de l'extrémité du joint codant à proximité de la séquence RSS. La recombinaison V(D)J permet donc in fine de générer un vaste répertoire d'immunoglobulines à partir d'un nombre restreint de gènes. En effet, grâce à l'utilisation des différents gènes du répertoire, des coupures de l'ADN quelquefois imprécises, ainsi que des diversités N et P, il est possible pour un individu de générer théoriquement jusqu'à  $10^9$  immunoglobulines différentes.

### 2.1.2 Hypermutation somatique

Le lymphocyte B sort de la moelle osseuse sans avoir jamais vu l'épitope de son antigène de membrane : la spécificité et l'affinité de l'anticorps membranaire, et par suite de l'anticorps circulant produit, sont donc déterminées avant la rencontre. Pour ajuster ces paramètres à l'antigène initiant une réaction immunitaire à médiation humorale, le clone de lymphocytes B activé va engager un phénomène d'hypermutations somatiques au sein des organes lymphoïdes secondaire et notamment du ganglion : la recombinaison génétique à l'origine de l'immunoglobuline produite va subir des mutations dans sa séquence qui vont ajuster les régions hypervariables à l'épitope. (**figure 3**)



Delker, Nat Immunol 2009

Figure 3. Mécanisme d'hypermutation somatique.

Les mutations qui ont lieu sur les segments variables des chaînes légères et lourdes, sont majoritairement des substitutions de bases. Elles surviennent la plus part du temps sur des

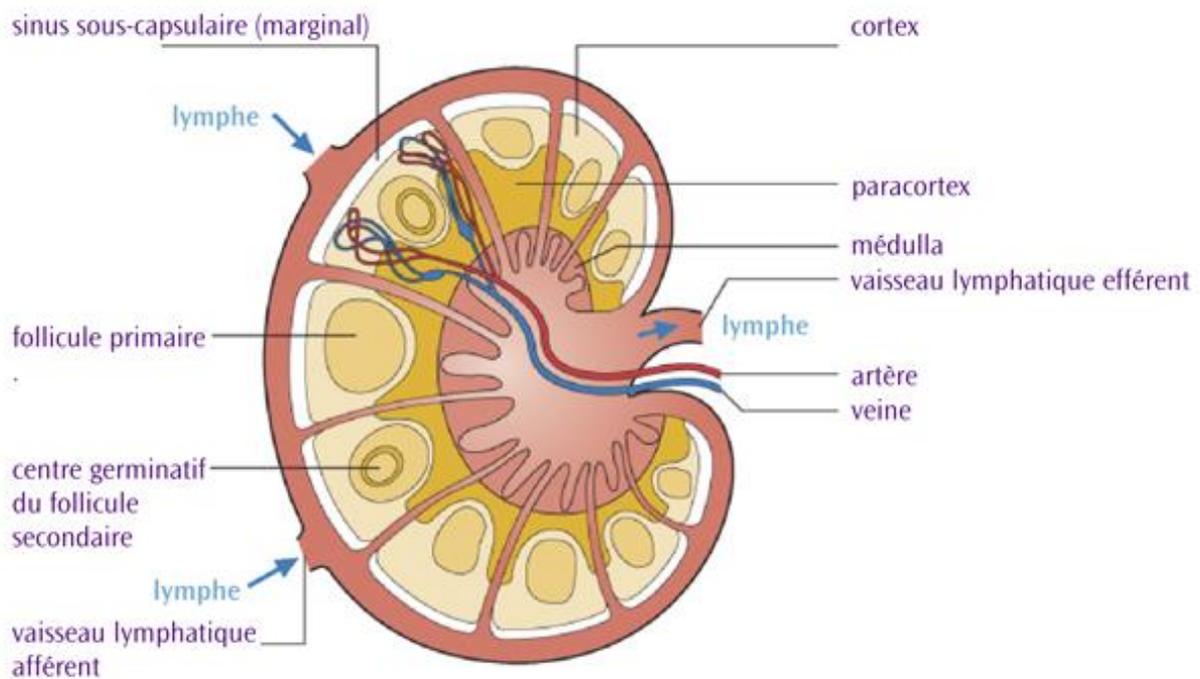
« hotspot » dépendant de la base mutée. RGYW pour un G, WRCY pour un C, WA pour un A et TW pour un T. Les insertions et délétions sont moins courantes. Ce phénomène participe majoritairement à la modulation de l'affinité de l'anticorps pour son épitope : le lymphocyte B dont l'immunoglobuline de membrane a une faible affinité pour un antigène pourra, sans recruter un autre lymphocyte B, augmenter l'affinité de l'anticorps pour l'antigène. Le processus d'hypermutation somatique dépend de l'activité de l'enzyme AID (activation induced cytidine deaminase), enzyme exclusivement exprimée dans les centres germinatifs *in vivo*.

Outre la régulation génétique du processus de recombinaison programmé des loci des gènes d'immunoglobuline, il existe aussi de multiples contrôles épigénétiques en particulier de l'accessibilité de la chromatine aux enzymes de recombinaison et de réparation des cassures V(D)J.

## **2.2 Origine cellulaire / architecture ganglionnaire**

Le système lymphatique, essentiel pour le système immunitaire est composé de ganglions lymphatiques disséminés à travers le corps humain et reliés grâce aux vaisseaux lymphatique. Ces ganglions lymphatiques sont réniformes et mesurent de 5 à 20 mm de diamètre. On en compte de 500 à 1000 disposés en amas ou en chaîne aux sites de convergence des vaisseaux lymphatiques. Ils sont entourés d'une capsule conjonctive formée de tissu conjonctif dense qui envoie des cloisons incomplètes délimitant des lobules. Dans les lobules, des cellules réticulaires, des fibres de réticuline formant une charpente autour des cellules lymphoïdes.

A cette structure globale, plusieurs vaisseaux lymphatiques affèrent en perforant la capsule sur sa face convexe pour converger au niveau d'un sinus sous capsulaire ou marginal. La lymphe chemine ensuite des sinus corticaux, dans les cloisons conjonctives, vers les sinus médullaires. Ces sinus médullaires convergent pour former un seul vaisseau lymphatique efférent situé au niveau du hile (**figure 4**).

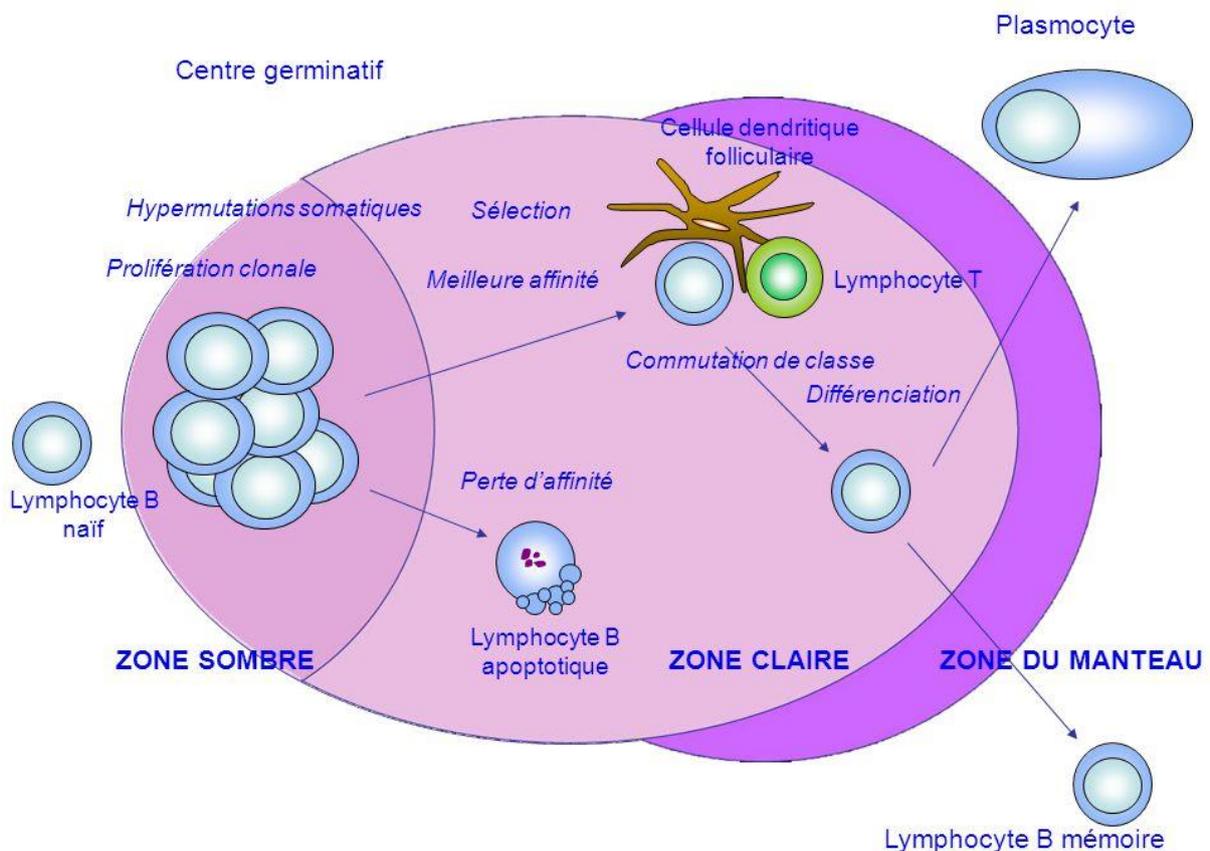


**Figure 4. Architecture du ganglion lymphatique**  
 © Lymphome Canada

Le ganglion sert donc de filtre à la circulation lymphatique. La lymphe, en circulant, amène les antigènes présents sur les cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes spécifiques. Elle parcourt le parenchyme ganglionnaire à travers trois régions anatomique et fonctionnellement différentes : le cortex, le para cortex et la médullaire.

Le cortex ou corticale est le siège des follicules lymphoïdes primaires et secondaires. Les follicules primaires sont composés d'une densité cellulaire homogène avec de petits lymphocytes étroitement tassés ne présentant pas de signes de prolifération. Les follicules secondaires contiennent de nombreux lymphocytes B en cours de prolifération (centroblastes), associés à des cellules dendritiques folliculaires présentatrices d'antigène et quelques macrophages ainsi que des lymphocytes T. Leur périphérie est dite sombre et la zone centrale claire, riche en lymphocytes plus volumineux et activés, c'est le centre germinatif. Ces lymphocytes n'apparaissent qu'après stimulation antigénique. Le centre germinatif, composé de lymphocyte B activés (centrocytes) et de cellules dendritiques, est le lieu de la différenciation des lymphocytes B. Ils s'engagent pour devenir soient des cellules B mémoire

soient des plasmocytes (cellule B effectrice) (**figure 5**). La zone colorée très sombre composée de lymphocytes B de petite taille très serrés forme un capuchon autour du centre clair : croissant ou manteau développé du côté externe du nodule et entouré d'une couche de cellules dendritiques folliculaires. Tout comme dans le para cortex, le tissu lymphoïde autour des follicules est composé majoritairement de lymphocytes T.



**Figure 5. Représentation schématique de la différenciation des lymphocytes dans le centre germinatif**

Le para cortex est un tissu lymphoïde diffus composé de lymphocytes T et de cellules interdigitées. C'est une zone de transition entre le cortex et la médullaire. Les lymphocytes circulent en son sein via les cordons médullaires pour rejoindre la médullaire. Ils sont entourés par des espaces médullaires qui les compriment. Ce procédé permet un ralentissement des lymphocytes et par conséquent une augmentation des interactions et des

communications cellulaires – antigène. C'est le site privilégié pour l'induction des réponses cellulaires T.

La médullaire forme une charpente réticulée assez lâche de cordons cellulaires comportant des lymphocytes et des plasmocytes. Elle communique avec le hile ganglionnaire et le vaisseau lymphatique efférent pour envoyer les cellules à travers la circulation lymphatique.

### Partie 3 - Présentation clinico-biologique des MCL

Les tableaux cliniques du lymphome à cellules du manteau sont assez hétérogènes compte tenu de la diversité des sites et des proliférations tumorales. Aucune des présentations cliniques qui suivent ne sont vraiment spécifiques du lymphome à cellules du manteau. De plus, le tableau est plus ou moins brutal en fonction de l'agressivité du lymphome ainsi que de son stade.

Au moment du diagnostic, la majorité des patients présentent un stade avancé et une forme disséminée de la maladie. Le stade de la maladie est défini par la classification de Ann Arbor.

Tableau 1. Classification d'Ann Arbor

Stade	Définition
I	Atteinte d'une seule aire ganglionnaire.
II	Atteinte de deux ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme.
III	Atteinte ganglionnaire des deux côtés du diaphragme.
IV	Atteinte viscérale avec au moins une atteinte ganglionnaire ou médullaire
Annotation	Définition
A	Aucun signe B
B	Amaigrissement inexplicé > 10% ou fièvre inexplicée > 38°C ou sueurs nocturnes
X	Masse tumorale volumineuse
E	Atteinte viscérale contiguë

Toute adénopathie suspecte doit faire l'objet d'une exploration par cyto-ponction ou mieux par biopsie afin d'éliminer une pathologie cancéreuse.

### **3.1 Présentation commune**

La forme commune du lymphome à cellules du manteau se caractérise par un syndrome tumoral majeur, à savoir des adénopathies superficielles multiples et disséminées, associées fréquemment à une atteinte extra-ganglionnaire (digestive ou ORL le plus souvent). Les adénopathies sont volontiers asymétriques, en règle générale indolores, chroniques (>1 mois) et non satellites d'une porte d'entrée infectieuse. Il peut exister aussi des adénopathies médiastinales révélées par une toux, une dyspnée, parfois associées à des épanchements pleuropéricardiques, des nodules pulmonaires. De manière exceptionnelle, des nodules cutanés sont présents lors des formes disséminés<sup>5</sup>. Des tableaux d'urgence sont à noter lors de la présence d'adénopathies compressives tels qu'un syndrome cave supérieur en cas d'adénopathie médiastinale ou d'occlusion intestinale /ascite en cas d'adénopathie abdominale.

A ces adénopathies s'associent fréquemment des signes généraux (amaigrissement, fièvre, sueurs nocturnes, asthénie), appelés aussi signes B.

### **3.2 Présentation indolente**

La forme indolente est plus frustre avec généralement une simple splénomégalie associée à une dissémination sanguine de l'hémopathie. La pathologie est alors suspectée lors de l'apparition des signes généraux : amaigrissement inexpliqué > 10% du poids, fièvre inexpliquée > 38°C pendant plus d'une semaine ou sueurs nocturnes profuses. Ces signes B ne sont pas spécifiques du lymphome à cellules du manteau et sont retrouvés de manière générale à travers l'ensemble des cancers.

Cette forme indolente correspond à un stade légèrement plus avancée d'un point de vue de la lymphogénèse. En effet, les cellules ont subi des modifications au niveau des immunoglobulines. La médiane de survie chez ces patients atteint presque les 10 ans.

### **3.3 Présentation in situ**

Enfin la forme *in situ* correspond à un lymphome très localisé, concernant seulement un ou quelques follicules<sup>2</sup>. La découverte est souvent fortuite liée à l'augmentation volumique d'un ganglion<sup>6</sup> ou découvert en association avec un autre lymphome<sup>7,8</sup>. Cette forme évolue fréquemment vers une présentation plus classique, elle correspond donc à un stade très précoce du lymphome où seule la zone ganglionnaire du manteau est épaissie avec une population clonale.

### **3.4 Diagnostic du lymphome à cellules du manteau**

Le lymphome à cellules du manteau, de par ses caractéristiques architecturales, morphologiques et moléculaires constitue une entité propre au sein des lymphomes. En effet, le diagnostic de lymphome repose sur la biopsie et l'analyse pluridisciplinaire d'un organe atteint.

#### **3.4.1 Hémogramme**

Au niveau de la numération sanguine, les anomalies ne sont pas majeures et demeurent très aspécifiques. On note une anémie modérée ainsi qu'une lymphocytose dans un tiers des cas. Ceci s'explique par le caractère ganglionnaire, donc localisé, de la pathologie. L'anémie est plus fréquemment rencontrée lors des envahissements médullaires par le lymphome.

#### **3.4.2 Anatomopathologie**

Dans la majorité des cas, au moment du diagnostic, la tumeur est composée exclusivement de cellules lymphoïdes de petite à moyenne taille, généralement légèrement plus grandes que des lymphocytes normaux. Elles présentent un noyau irrégulier ou clivé, une chromatine très dispersée, un cytoplasme pâle et réduit, et des nucléoles discrets. Le diagnostic étant le plus souvent fait à des stades avancés de la maladie, l'architecture ganglionnaire est très souvent détruite. On se retrouve avec une destruction de l'architecture et un envahissement diffus par les cellules malignes. Cependant, dans 30% des cas, il persiste

un aspect nodulaire avec un épaissement de la zone du manteau et conservation partielle de l'architecture ganglionnaire.

La prolifération tumorale peut être évaluée soit par l'index mitotique (MIB1), soit par l'index Ki-67, qui est un antigène présent sur les cellules en division. L'index Ki-67 est fortement corrélé à l'index mitotique. Son expression varie entre 1 et 70%. Ce sont deux marqueurs importants de la multiplication cellulaire. Le Ki-67 s'obtient préférentiellement à partir de tissus congelés, mais maintenant aussi sur tissus paraffinés, alors que MIB1 s'obtient à température ambiante sur des tissus paraffinés.

### **3.4.3 Cytologie**

Quatre types de variants morphologiques ont été identifiés : variant classique (87%), variant à petites cellules (4%), variant pleïomorphe (16%), variant blastoïde (3%)<sup>9,10</sup>.

Le variant classique se présente avec des cellules de taille petite à moyenne (12 - 20 µm). Leur rapport nucléo-cytoplasmique (N/C) est proche de 1. Le noyau a un contour irrégulier, avec la présence d'encoques et un aspect folié. Lorsqu'il est présent, le nucléole reste discret. La chromatine est discrètement immature et le taux de prolifération est plutôt faible.

Le variant à petites cellules s'apparente aux lymphocytes de la LLC ou aux petits lymphocytes du lymphome lymphocytaire. Ils ont une taille avoisinant les 10 – 12 µm, un noyau rond un rapport N/C proche de 1 et une chromatine nucléaire dense. Le taux de prolifération est faible.

Le variant pleïomorphe montre un mélange de cellules tumorales avec des noyaux de différentes tailles (moyennes et grandes) et des formes mimant le lymphome B à grandes cellules. La chromatine est immature et associée à un proéminent nucléole, le rapport N/C est plus faible et le taux de prolifération est élevé. Souvent, la variante pleïomorphe montre un mélange de blastes avec des noyaux ovoïdes ou foliés ressemblant à des centrocytes classiques.

Le variant blastoïde présente des cellules de taille moyenne à grande (15 – 25 µm), avec un rapport N/C proche de 1. La chromatine est largement immature, foliée avec un nucléole fréquemment visible. Le taux de prolifération est élevé et la présence de corps apoptotique est fréquente.<sup>11</sup> (figure 6)

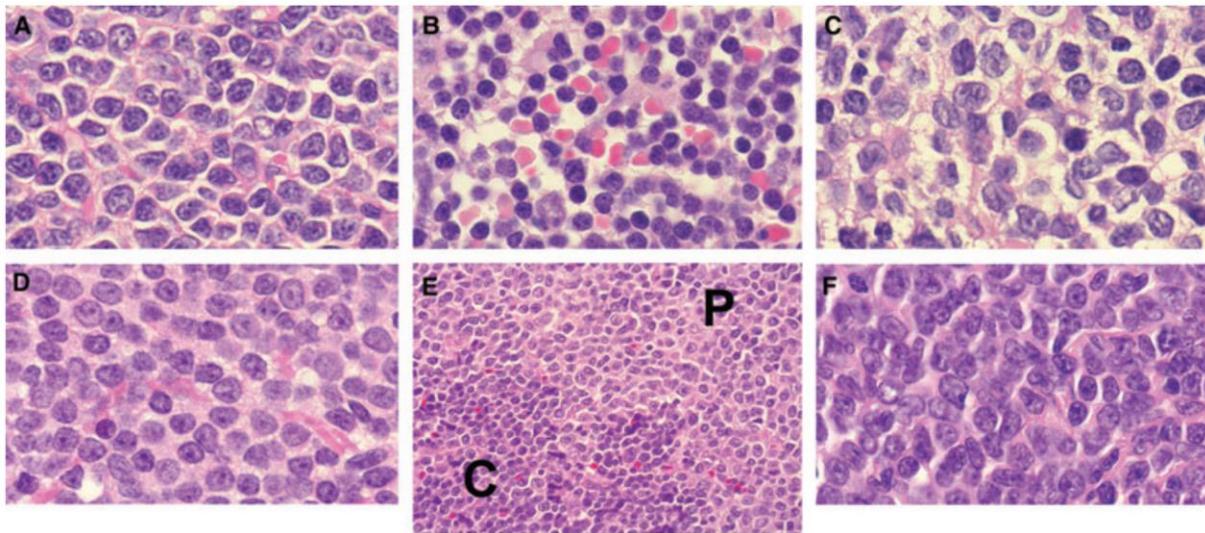


Figure 6. Analyse microscopique des différentes formes de lymphome à cellules du manteau.

- A) variant classique B) variant a petites cellules C) variant pleiomorphe D) variant blastoïde  
E) variant classique + pleiomorphe type F) variant classico-pleiomorphic

### 3.4.4 Immunophénotypage

L'immunophénotypage par cytométrie en flux permet d'étudier à haut débit, par immunofluorescence, toute préparation cellulaire en suspension. Les antigènes exprimés par une cellule (« CD » : Cluster of Differentiation) permettent de la caractériser à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes. Certaines structures cellulaires peuvent également être mises en évidence directement, sans anticorps.

Différents CD sont utilisés afin d'orienter et affiner le diagnostic. Les premiers utilisés sont ceux permettant de distinguer les pathologies lymphoïdes B des pathologies lymphoïdes T. Les CD 20 et CD19 sont spécifiques des lymphocytes B tandis que les CD3 et CD4 sont spécifiques des lymphocytes T. Le CD23 oriente vers une leucémie lymphoïde chronique. Le CD10 est retrouvé préférentiellement dans les lymphomes provenant du centre germinatif à

savoir, les lymphomes folliculaires, le lymphome de Burkitt et les lymphomes à grand cellules B activées originaires du centre germinatif. Les marqueurs permettant de caractériser un MCL sont récapitulés dans le **tableau 2**.

**Tableau 2. Marqueurs d'immunophénotypage**

Marqueurs	MCL
CD5	+
CD10	-
CD19	+
CD20	+
CD23	-

Il est à noter qu'il existe des lymphomes du manteau CD5 négatif<sup>12</sup>. Grâce à l'ensemble de ces marqueurs, et dans le cadre de pathologie lymphoïde à petites cellules, il est réalisé le score de Matutes (**tableau 3**). Celui-ci s'appuie sur différents résultats de l'immunophénotypage et permet de d'établir le diagnostic de LLC en cas de score entre 4 et 5. Dans le cas d'un MCL, le score de Matutes sera faible, variant de 1 à 2.

**Tableau 3. Score de Matutes**

SCORE MATUTES	1 pt	0 pt
CD5	+	-
CD23	+	-
FMC7	-	+
Expression Ig surface	Faible expression	Forte expression
Expression CD79b	Faible expression	Forte expression

### 3.4.5 Cytogénétique / Cytogénomique

La cytogénétique tumorale permet de détecter les anomalies chromosomiques de nombre ou de structure présentes dans une cellule maligne. Le caryotype est réalisé après culture des cellules ganglionnaires pendant 72h en présence d'un agent stimulant (DSP30 (oligonucléotide non méthylé) + IL2) et le blocage des cellules en métaphase par poison du fuseau mitotique (Colcemid). Cette culture cytogénétique peut s'effectuer sur ganglion, rate, moelle et sang. L'analyse caryotypique permet alors de détecter des anomalies de nombre (gains ou pertes de chromosomes) et des anomalies de structure, translocations, délétions, duplications de chromosomes. Le lymphome du manteau est caractérisé par la translocation réciproque  $t(11;14)(q13;q32)$ , responsable de la juxtaposition du gène *CCND1* (11q13), codant la cycline D1 (*CCND1*), un régulateur du cycle cellulaire, sous le contrôle du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH) (14q32) (**figure 7 A**).

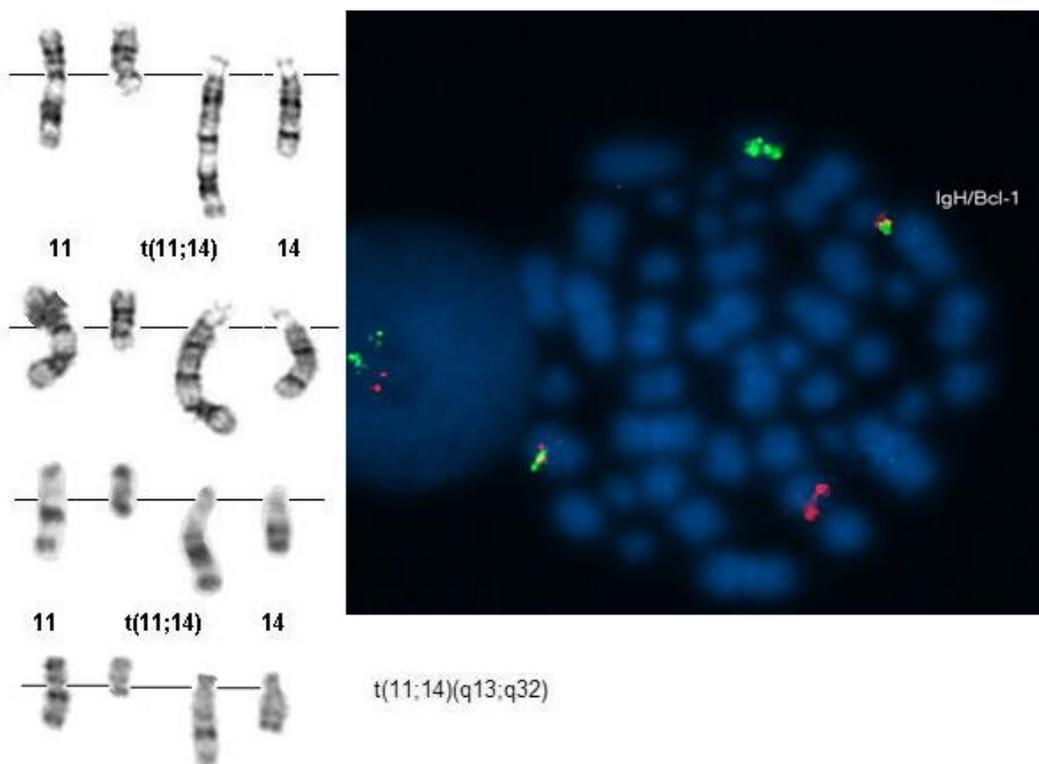
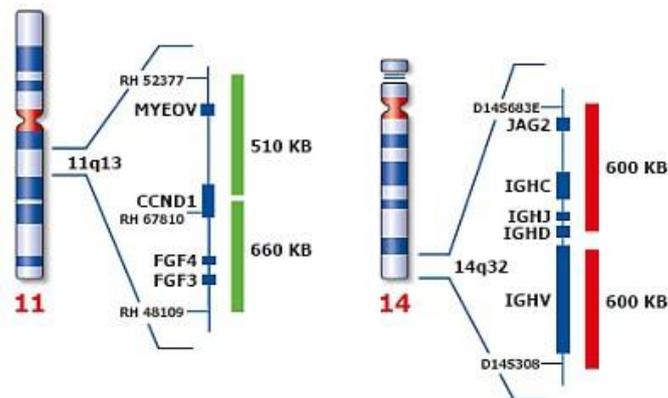


Figure 7. Translocation  $t(11;14)$  (A) caryotype et B) analyse FISH sonde double fusion)

Cette translocation est retrouvée dans 95% des caryotypes de MCL obtenus après culture avec DSP30. Elle peut aussi être mise en évidence par technique FISH (Fluorescent In Situ Hybridisation) en utilisant une sonde double fusion<sup>13</sup>. La sonde double fusion utilise deux amorces, l'une ciblant le gène des immunoglobulines *IGH* sur le chromosome 14 en q32 et l'autre ciblant le gène de la cycline D1 sur le chromosome 11 en q13 (**figure 7 B, figure 8**).

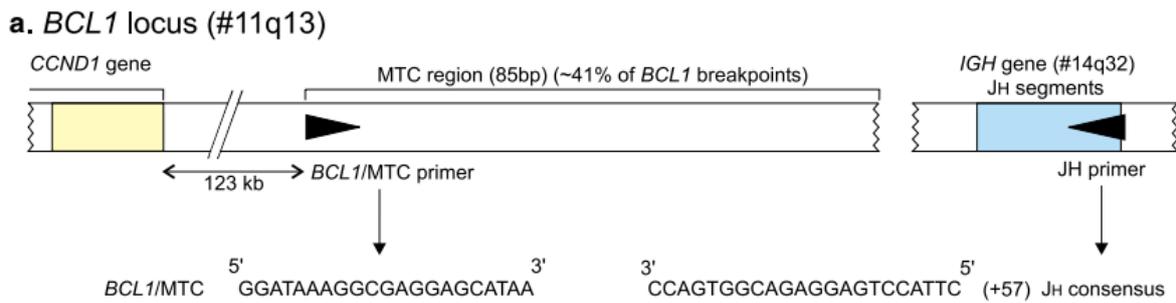


**Figure 8. Sonde double fusion utilisée en FISH**

On retrouve la t(11;14) dans près de 95% des cas de MCL. Pour les 5% restant, on peut retrouver une translocation variante (3 partenaires), une translocation t(2;11)(p11;q13) *IGK/CCND1* ou t(11;22)(q13;q11) *IGL/CCND1* ou encore des MCL *CCND1*-négatifs. Dans ces derniers cas, un réarrangement avec le gène de la cycline D2 (*CCND2*) est le plus fréquemment retrouvé<sup>14</sup>. La t(11;14), bien que fortement associée au MCL, ne lui est pas spécifique. En effet, elle peut être retrouvée dans 15% des myélomes, dans de très rares cas de lymphome B diffus à grandes cellules (quadruple-hit) et enfin dans 20% des cas de leucémies prolymphocytaires B.

En complément d'analyse, la translocation peut être recherchée par PCR (primers consensus Biomed). On utilise un couple d'amorces avec d'une part une amorce JH consensus et d'autre part une amorce ciblant un point de cassure sur le chromosome 11. Ce choix est basé sur le fait que ce point de cassure est celui qui est le plus loin et le plus rapporté dans la littérature<sup>15</sup>. Le primer choisi a été désigné par le programme OLIGO6.2 et donne une amorce s'hybridant à 472 pb de la région d'intérêt (50-GGATAAAGGCGAGGAGCATAA-30). Cependant, le

nombre de points de cassure sur le chromosome 11 étant très important, seul 35% des t(11 ;14) peuvent être mises en évidence par cette technique<sup>15</sup>. (**figure 9**)



**Figure 7. détection d'une translocation t(11,14)(q13q32) par PCR**

Extrait de *JJm Van Dongen Leukemia, 2003*

La t(11 ;14) est par ailleurs rarement isolée dans les MCL; elle s'accompagne en général de multiples anomalies, avec de nombreux déséquilibres génétiques comme la del(1)(p21p22) retrouvée dans 30% des cas, del(9)(p21) conduisant en la perte d'expression de P16/P14ARF et/ou le gain 3q (3q25-qter) retrouvé dans 30 à 70% des cas, le gain 10p11-12 retrouvé dans 20% des cas<sup>16,17</sup>

### 3.4.6 Immunogénétique et MRD

#### *Réarrangement des gènes d'immunoglobulines*

Il est tout à fait possible, en génétique moléculaire d'effectuer une recherche de proliférations lymphocytaires monoclonales par méthode PCR<sup>15</sup>. Celle-ci consiste en une analyse PCR en hétéroduplex ou en Gene scanning ou plus récemment NGS (« next generation sequencing »). La recherche de clonalité est basée essentiellement sur la détection d'un réarrangement clonal IGH (jonction V(D)J) clone V (étude des chaînes lourdes des immunoglobulines), par des méthodes consensus Biomed<sup>15</sup>. Le couple d'amorce utilisé correspond à un JH consensus d'une part et à un pool de primer famille VH spécifique. D'autres PCR peuvent être réalisées en vue d'une recherche de clonalité. Elles concernent l'étude de la région D-JH ou bien

l'étude des chaînes légères. Elles appliquent le même principe que pour l'étude des chaînes lourdes des immunoglobulines, à savoir une amplification de l'ADN par PCR en utilisant le couple d'amorce suivant : JH consensus – pool de primer.

Le séquençage des réarrangements clonaux V(D)J dans les MCL a surtout permis de développer des outils de suivi de la réponse moléculaire aux traitements ('MRD' – minimal residual disease)<sup>18</sup>. Le suivi de la MRD est en émergence comme marqueur pronostique précoce de la survie sans progression et globale dans les MCL ainsi que comme aide thérapeutique au cours d'un traitement d'entretien ('maintenance on demand'). Un consortium européen constitué de 10 laboratoires référents veille sur la standardisation internationale des pratiques et la définition de la réponse moléculaire dans les MCL.

### *Cycline D1*

La cycline D1, une cycline de type D qui n'est pas exprimée dans les lymphocytes normaux B, joue un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire au cours de la transition de la phase G1 à la phase S. Se liant aux protéines CDK4 et CDK6, elle forme un complexe CDK/cycline capable de phosphoryler le gène suppresseur de tumeur rétinoblastome (RB1), facilitant ainsi la progression du cycle cellulaire<sup>19</sup>.

La t(11;14)(q13;q32) étant quasiment pathognomonique du MCL, la recherche de la cycline D1 s'avère être un outil tant de diagnostic que de suivi. En effet, s'il est possible d'étudier le type de cycline exprimé au sein d'un échantillon tumoral, à savoir caractériser entre la cycline D1, D2 et D3, il est de même possible de suivre son évolution par PCR quantitative.

La recherche du type de cycline s'effectue par RT-PCR et permet d'orienter le diagnostic lorsque la t(11;14)(q13;q32) est absente. La pathogénèse s'explique alors par la surexpression de la cycline D2 ou la cycline D3. Pour le suivi, une PCR en temps réel ou PCR quantitative est réalisée après une étape de reverse transcription. Celle-là s'effectue avec de l'ARN dérivé de tissu sain témoin apparié pour comparaison.

## *Sox11*

SOX11 est un facteur de transcription neuronal impliqué dans le développement du système nerveux central chez l'embryon. Il est aussi impliqué dans la neurogénèse, la survie des cellules neuronales et la croissance des neurites. Il participe également dans la détermination du destin cellulaire, tels que la différenciation sexuelle et l'organogénèse<sup>20</sup>.

Les mutations et la surexpression de ce facteur de transcription ont été mises en évidence dans plusieurs pathologies telles que le retard mental autosomique dominant, le syndrome de Coffin Siris, le gliome malin et le lymphome à cellules du manteau. Le taux ARNm a été retrouvé exprimé de manière plus importante dans les gliomes que dans le tissu cérébral sain ce qui suggère que SOX11 pourrait participer à la transformation maligne ainsi qu'à la survie cellulaire<sup>20</sup>. Cette protéine d'expression nucléaire a été évaluée au sein des pathologies lymphoïdes afin de montrer la spécificité de SOX11 au MCL. SOX11 est fortement exprimé dans la quasi-totalité des MCL (93%) alors que le taux est indétectable dans tous les lymphomes folliculaires, lymphomes B à grandes cellules, leucémie lymphoïde chronique, lymphome de la zone marginale (splénique ou ganglionnaire), lymphome T<sup>21,22</sup>. Il a tout de même été montré que le lymphome de Burkitt et la leucémie à tricholeucocyte pouvaient exprimer faiblement SOX11<sup>21</sup>.

Comme vu précédemment, l'ensemble des MCL n'exprime pas la cycline D1. Si tous les MCL exprimant la cycline D1 ne sont pas SOX11 positif, il s'avère que 100% des MCL cycline D1 négatif le sont ; c'est pourquoi SOX11 se positionne comme un bon biomarqueur pour ces cas de MCL<sup>20</sup>. SOX11 semble donc un marqueur intéressant pour le MCL, d'une part car il joue un rôle important lors de diagnostic difficile mais aussi car à l'instar de la cycline D1, SOX11 peut être étudié en qRT-PCR afin de permettre un suivi du patient.

De plus, il a été rapporté que SOX11 aide non seulement dans le diagnostic des cas de MCL cycline D1 négatifs, au suivi mais contribue également à distinguer les MCL indolents des

MCL classiques<sup>20</sup>. Les MCL indolents ont plusieurs gènes sous-exprimés par rapport à MCL classique plus agressive, SOX11 étant l'un d'entre eux.

## **Partie 4 – Paysage mutationnel des MCL**

Bien que la cycline D1 soit surexprimée dans le MCL, il a été montré que la seule surexpression ne permet pas d'induire le développement d'un MCL *in vivo*<sup>11</sup>. De plus, l'existence de MCL Cycline D1 négatif<sup>23</sup> implique nécessairement une approche de la tumorigénèse plus complexe avec une atteinte de plusieurs voies cellulaires. En effet, quand les récepteurs présents sur la membrane des cellules B se lient à des ligands externes, un réseau complexe de voies de signalisation intracellulaire s'active. La fonction de la cellule B mais aussi sa survie sont largement dépendantes de ces voies interconnectées. Et lorsqu'une mutation somatique affecte une voie de signalisation, il s'ensuit une perturbation de l'ensemble de la régulation de l'activité cellulaire.

### **4.1 Concept de mutation driver et mutation passagère**

Les mutations observées dans les cellules malignes, s'acquièrent au fil du temps. Certaines de ces mutations sont primordiales à la survie du cancer alors que d'autres sont mineures. Il convient donc de différencier deux types de mutations, d'une part, les mutations « driver », mutations arrivant à un stade précoce du cancer et d'autre part, les mutations « passagères », survenant à un stade plus avancé de manière clonale ou sous-clonales et pouvant jouer un rôle important en termes de pronostic. Cette distinction entre ces deux types de mutations ne peut se faire que sur des échantillons successifs d'un même patient, par exemple le diagnostic et la rechute. Ceci permet alors d'établir des arbres de tumorigénèse pour potentiellement mieux guider la thérapeutique dans les années à venir et ce d'autant grâce à l'avènement du séquençage dit haut débit WES ou WGS (Whole Exome/Genome Sequencing). Concernant le lymphome à cellules du manteau, il n'existe à ce jour, aucune réelle mutation driver identifiée.

## 4.2 Paysage mutationnel des grandes familles de voies cellulaires touchées

De nombreux gènes et protéines à travers différentes voies de signalisation ont été décrits avec des délétions ou mutations. Parmi celles-ci, on note principalement une atteinte ou un dysfonctionnement au sein de la régulation du cycle cellulaire avec notamment les protéines Cycline D1, ATM et Ki67. Des régulateurs de la transcription tels que *Sox11*, *STAT3*, Nuclear factor Kappa Beta (NFKB) sont aussi affectés ainsi que des gènes suppresseurs de tumeur comme *TP53*.

Notamment, il a été décrit les mutations somatiques de 29 cas de lymphomes à cellules du manteau par WES ainsi que le séquençage ciblé d'une cohorte indépendante de 172 patients. Parmi eux, 69% (20/29 cas) sont des échantillons collectés au diagnostic tandis que 21% sont recueillis après traitement et 10% après progression/rechute de la maladie. 60% de ces échantillons proviennent du sang périphérique et 32% de ganglions lymphatiques (5% colon/amygdale ; 3% rate).<sup>24</sup>

Cette équipe a identifié 25 gènes significativement mutés de façon récurrente dans le lymphome à cellules du manteau, les plus fréquemment mutés étant ceux codant pour les protéines ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (41.4% ; 12/29), la cycline CCND1 (34.5% ; 10/29), le suppresseur de tumeur TP53 (31% ; 8/29), les méthyltransférases MLL2 (14% ; 4/29) et WHSC1 (14% ; 4/29), l'ubiquitine ligase BIRC3 (6% ; 3/29), le facteur de transcription MEF2B (3% ; 2/29) et le récepteur de type Toll, TLR2 (1% ; 2/29). D'autres mutations, plus rares (<1%), sont également décrites comme par exemple, les mutations au sein du gène codant le facteur de transcription LUZP4 (*Leucine Zipper Protein 4*), l'enzyme DCP1B (*mRNA-decapping enzyme 1B*) et la protéine SP140 (*nuclear body protein*)<sup>24</sup>. (**figure**

**10)**

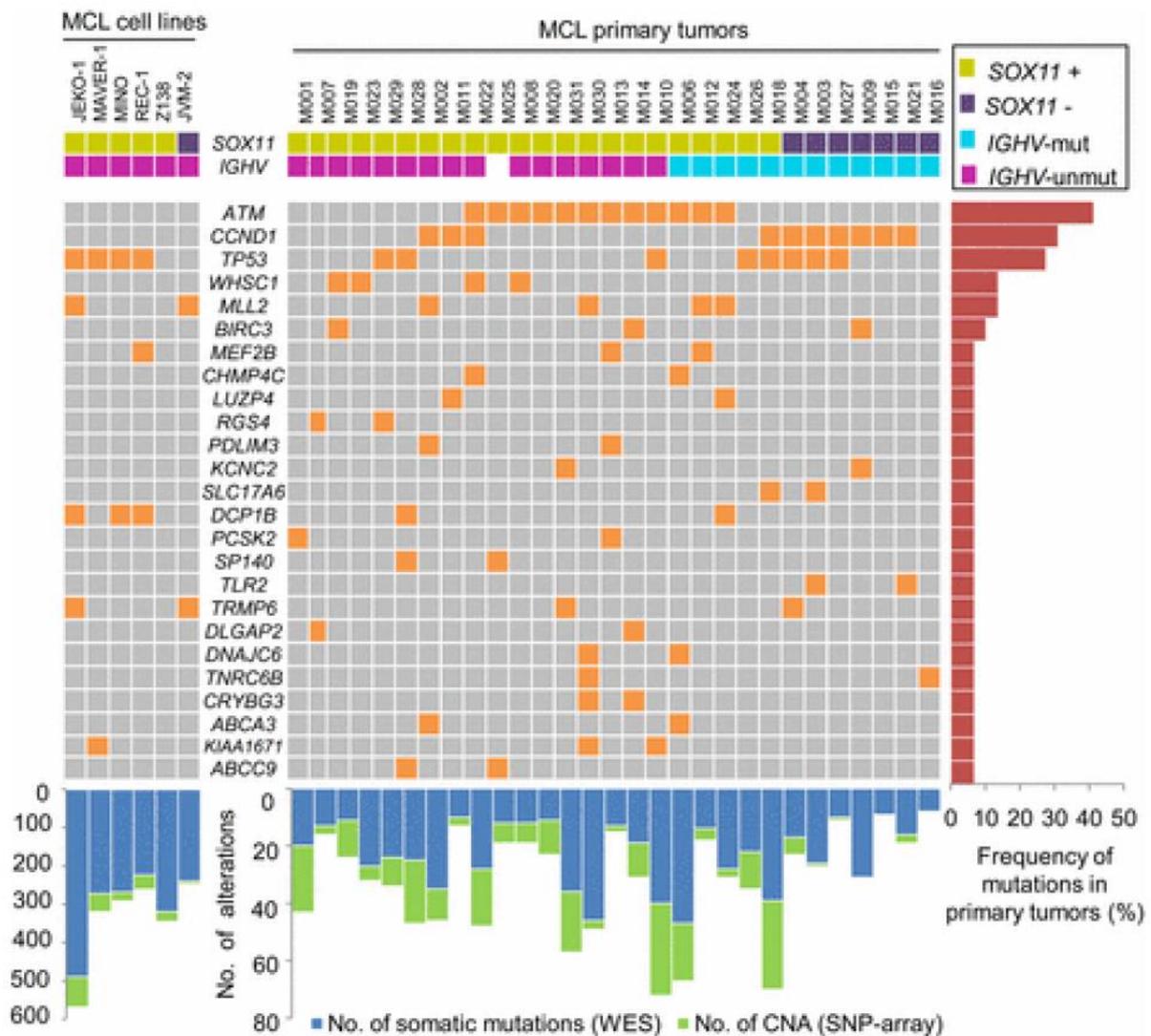


Figure 8. WES effectué sur 29 cas et 6 lignées cellulaires dérivées de lymphomes à cellules du manteau (MCL).

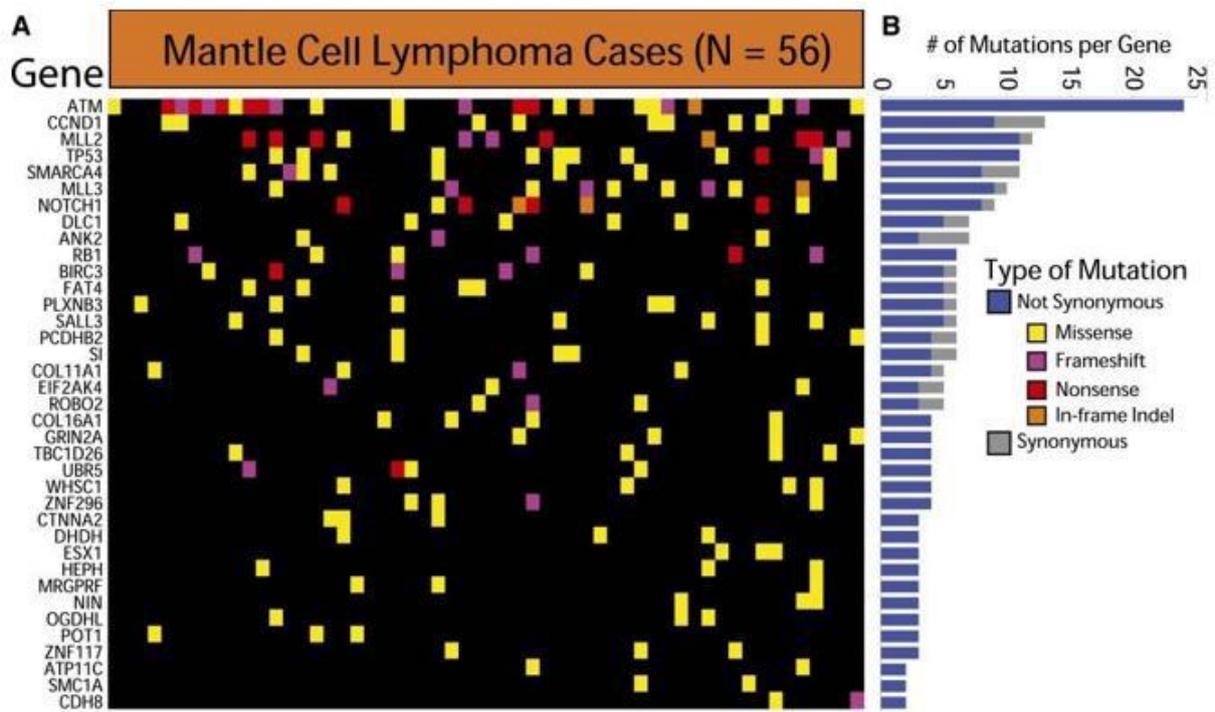
Heatmap représentant les 37 cas étudiés. Chaque ligne représente un gène pour lequel un variant somatique a été identifié et chaque colonne représente une tumeur primaire ou une lignée cellulaire de MCL. Les barres verticales représentent le nombre total de mutations somatiques identifiées par WES (bleu) et le nombre d'altérations du nombre de copie d'ADN (CNA) détectées par SNP array (vert). Les caractéristiques de l'échantillon (expression SOX11, statut du gène IGHV) sont représentées par les cases de couleur vertes (SOX11+), violettes (SOX11-), fuchsia (IGHV non muté) et cyan (IGHV muté)<sup>24</sup>.

Un autre étude, ayant séquencé l'ARN issus de 18 patients et deux lignées cellulaires dérivées de lymphomes à cellules du manteau (Mino et Jeko-1), a permis d'identifier 18 gènes mutés de façon récurrente : *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*), *ATMIN* (*ATM interactor*), *CCND1* (*cyclin D1*), *CD14* (*CD14 molecule*), *CDKN2A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*), *CHD2* (*chromodomain helicase DNA binding protein 2*), *CHEK1* (*checkpoint kinase 1*), *CHEK2* (*checkpoint kinase 2*), *CUL1* (*cullin 1*), *ETS1* (*ETS proto-oncogene 1, transcription factor*), *MEF2B* (*myocyte enhancer factor 2B*), *NOTCH1* (*notch 1*), *PTPRCAP* (*protein tyrosine phosphatase, receptor type C-associated protein*), *RBI* (*RB transcriptional corepressor 1*), *TET2* (*tet methylcytosine dioxygenase 2*), *TP53* (*tumor protein p53*), *TRAF2* (*TNF receptor associated factor 2*) et *UBR5* (*ubiquitin protein ligase E2 component n-recognin 5*). Par ailleurs, des mutations fréquentes au sein du gène *UBR5*, codant pour une ubiquitine ligase E3, ont été décrites pour la première fois et ce de façon inattendue dans 17,6 % (18/102) des cas dont 15 cas au diagnostic et 3 cas en rechutes (1 non-sens, 7 faux-sens, 3 indels et 7 sites d'épissage)<sup>25</sup>.

Par la suite, le séquençage ciblé de 92 cas de lymphomes à cellules du manteau pris au diagnostic ont permis d'identifier des mutations principalement au sein de: *ATM* (50%), *CCND1* (18,6%), *MEF2B* (6.8%), *NOTCH1* (12%), *TP53* (13.7%) et *TRAF2* (4,9%), toutes confirmées par séquençage Sanger.<sup>25</sup> Parallèlement, une autre étude de l'équipe de Gascoyne a montré d'ailleurs que les mutations au sein du gène *NOTCH1* et particulièrement les mutations délétères survenant dans le domaine PEST (proline (P), acide glutamique (E), sérine (S), thréonine (T)) de *NOTCH1* seraient associées à un mauvais pronostic ( $p=0.003$ )<sup>26</sup>.

Plus récemment encore, le paysage mutationnel du lymphome à cellules du manteau a été décrit à travers le Whole Exome Sequencing (WES) de 56 cas parmi lesquels 78.5% des échantillons sont des ganglions lymphatiques (44/56 cas), 8.5% sont des rates (5/56) et 12,5%

des échantillons provenant de sources diverses (2 amygdales, 2 masses nasopharyngienne, 1 masse axillaire, 1 masse inguinale, 1 masse provenant de l'estomac). Cette équipe a confirmé les mutations au sein des gènes *ATM* (42,8% ; 24/56), *TP53* (19.6% ; 11/56), *MLL2* (19.6% ; 11/56), *CCND1* (16% ; 9/56) et *NOTCH1* (14.2% ; 8/56) et a identifié de nouvelles mutations pertinentes au sein des méthyltransférases *MLL3* (16% ; 9/56) et *WHSC1* (7.1% ; 4/56), du régulateur chromatinien *SMARCA4* (SWI/SNF related matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4) (14.2% ; 8/56), des suppresseurs de tumeurs *RB1* (RB transcriptional corepressor 1) (10.7% ; 6/56) et *DLC1* (DLC1 Rho GTPase activating protein) (9% ; 5/56), de l'ubiquitine ligase *BIRC3* (baculoviral IAP repeat containing 3) (9% ; 5/56), des cadhérines *FAT4* (FAT atypical cadherin 4) (9% ; 5/56) et *CDH8* (cadherin 8) (3.5% ; 2/56), des facteurs de transcriptions *SALL3* (sal-like transcription factor 3) (9% ; 5/56), *ZNF296* (Zinc finger protein 296) (7.1% ; 4/56), *ZNF117* (Zinc finger protein 117) (5.4% ; 3/56) et *ESX1* (ESX homeobox 1) (5.4% ; 3/56), de la protéine *POT1* (protection of telomere 1) (5.4% ; 3/56) impliquée dans la protection des télomères, de la kinase *EIF2AK4* (eukaryotic translation initiation factor 2 alfa kinase 4) (5.4% ; 3/56), de la caténine *CTNNA2* (catenin alpha 2) (5.4% ; 3/56), de la deshydrogénase *OGDHL* (oxoglutarate dehydrogenase-like) (5.4% ; 3/56) et de l'ATPase *ATP11C* (ATPase phospholipid transporting 11 C) (3.5% ; 2/56)<sup>27</sup>. (**figure 11**)



**Figure 9. Le séquençage exonique du lymphome à cellules du manteau révèle des gènes mutés de façon récurrente.**

(A) Heatmap illustrant le profil de mutations non-synonymes des 37 gènes les plus fréquemment mutés dans une cohorte de 56 cas de lymphomes à cellules du manteau. Chaque colonne représente un patient, et chaque ligne représente un gène. Mutations faux-sens (jaune), mutations avec décalage du cadre de lecture (violet), mutation non-sens/ stop (rouge), insertions ou délétion avec conservation du cadre de lecture (orange). (B) L'histogramme indique la fréquence des variants identifiés pour chaque gène dans l'ensemble de la cohorte, subdivisé en mutations non-synonymes (bleu) et mutations synonymes (gris).<sup>27</sup>

Il a été également décrit par cette équipe que le paysage mutationnel du lymphome à cellules du manteau est distinct de celui des autres lymphomes issus des cellules B. Dans ce contexte, des études de la structure chromatinienne de tumeurs primaires issues de lymphocytes B naïfs, du centre germinatif ainsi que de lymphocytes B mémoires, ont été réalisées pour la première fois à partir d'expériences d'immunoprécipitation de la chromatine couplée à un séquençage à haut débit (ChIP seq). Ainsi, il a été démontré que les mutations somatiques survenant plus fréquemment dans le lymphome à cellules du manteau par rapport aux autres lymphomes B,

sont associées à une structure ouverte (euchromatine, ADN actif) de la chromatine. De ce fait, ce travail a permis de montrer la connexion entre la structure de la chromatine et l'acquisition de mutations génétiques somatiques dans le lymphome à cellules du manteau<sup>27</sup>.

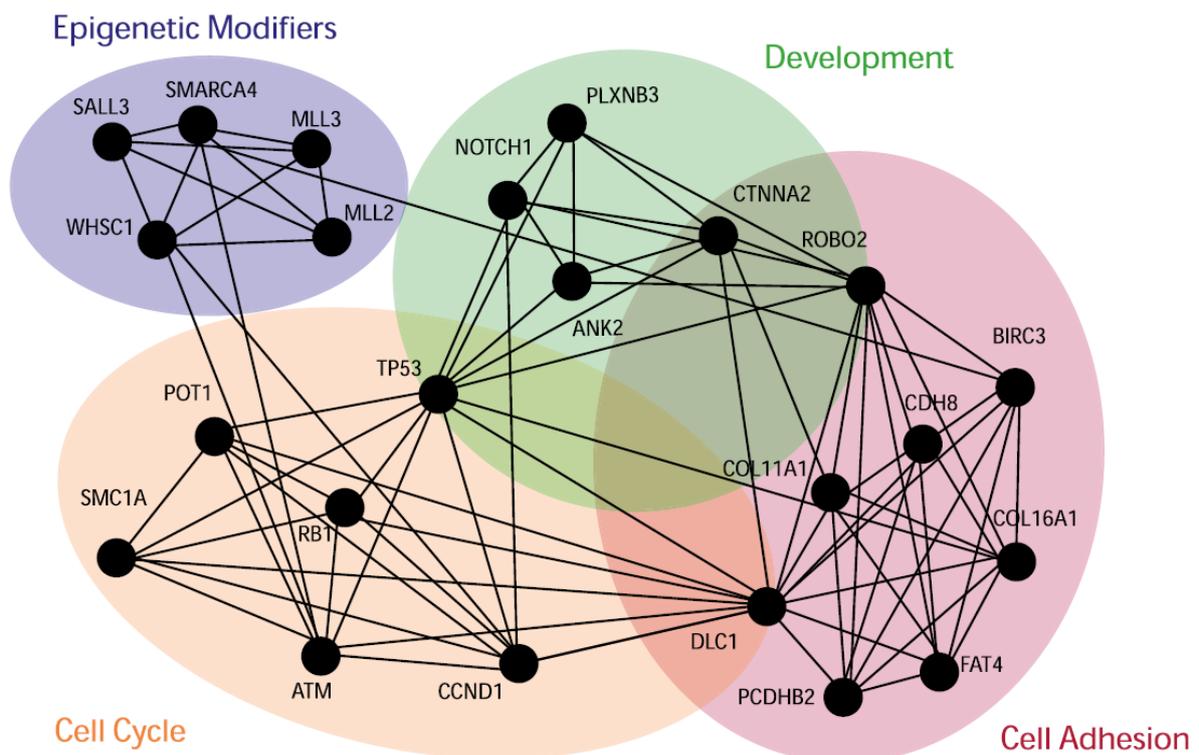
De même, le séquençage ciblé d'une cohorte de 165 échantillons primaires de lymphomes à cellules du manteau a également confirmé les mutations au sein des gènes *ATM* (49.6% ; 82/165), *CCND1* (18.8% ; 31/165), *UBR5* (18,1% ; 30/165), *MLL3* (26/165 ; 15,7%), *TP53* (23/165 ; 13.9%), *NOTCH1* (23/165 ; 14%), *BIRC3* (8% ; 16/165).<sup>28</sup>

D'autres mutations ont également été identifiées telles que les mutations au sein de gènes codant l'ubiquitine ligase TRAF2 (7% ; 10/165) et de la kinase MAP3K14 (*Mitogen-Activated Protein 3 Kinase 14*), également appelée NIK (*Kinase inhibitrice de la voie NF-κB*) (2% ; 3/165), toutes deux impliquées dans une voie de signalisation alternative (non-canonique) NF-κB. Ces altérations au sein de TRAF2 et MAP3K14 pourraient constituer un mécanisme possible de résistance des patients aux thérapies inhibitrices de la voie de signalisation issue du BCR telles que l'Ibrutinib, un inhibiteur de BTK (*Tyrosine Kinase de Bruton*). En effet, ces patients réfractaires à l'Ibrutinib auraient activé cette signalisation NF-κB alternative, suite aux mutations TRAF2 et/ou MAP3K14. Ainsi, MAP3K14, pourrait être considérée comme la nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du lymphome à cellules du manteau en restaurant son inhibition via TRAF2<sup>27</sup>.

Enfin, la pertinence clinique de ces mutations a été examinée dans un essai prospectif de phase III chez des patients jeunes atteints de lymphomes à cellules du manteau traités par R-CHOP, suivi de fortes doses de cytarabine et greffe autologue de cellules souches hématopoïétiques, en séquençant en profondeur (2356x), 151 échantillons d'ADN issus de cellules purifiées CD19+ de moelle osseuse avec un panel de 8 gènes : *ATM*, *CCND1*, *TP53*, *MLL2*, *WHSC1*, *BIRC3*, *TRAF2* et *NOTCH1*. Globalement, au moins une mutation a été détectée dans 70% (106/151) des cas, incluant des mutations au sein des gènes *ATM* (42%), *CCND1* (14%), *WHSC1* (13%), *MLL2* (12%), *TP53* (7%), *NOTCH1* (6%), *BIRC3* (5%) et

*TRAF2* (1%). Une analyse univariée a d'ailleurs démontré que les mutations *TP53* et *MLL2* sont associées à une plus courte survie sans progression (PFS) : (*TP53* : PFS de 2 ans de 48% vs 82% ;  $p > 0.0001$  et *MLL2* : PFS de 2 ans 67% vs 81% ;  $p = 0.004$ ). Ainsi, les gènes *TP53* et *MLL2* pourraient être considérés comme de nouveaux biomarqueurs génétiques chez les patients atteints de lymphomes à cellules du manteau<sup>29</sup>.

En somme, les mutations somatiques récurrentes associées au lymphome à cellules du manteau décrites à travers ces études affectent surtout cinq voies de signalisation cruciales des cellules B. Il s'agit des voies de signalisation associées au BCR, au TLR (Toll-like receptor), ainsi qu'à NOTCH, NF- $\kappa$ B et aux protéines kinases MAPK. Par ailleurs, le rôle de la voie alternative NF- $\kappa$ B dans les cas de lymphomes à cellules du manteau résistants à l'Ibrutinib a été discuté précédemment<sup>28</sup>. **(figure 12)**



(Zhang et al, BLOOD, 2013)

Figure 10. Voies de signalisation affectées dans le lymphome à cellules du manteau

#### 4.2.1 Méthylation de l'ADN

Outre les mutations somatiques récurrentes, une étude récente s'est intéressée au profil de méthylation de l'ADN dans le lymphome à cellules du manteau. Les résultats indiquent un fort lien entre la méthylation dynamique de l'ADN lors de la maturation des cellules B et la tumorigénèse du lymphome à cellules du manteau. L'étude a permis d'établir deux sous-groupes de MCL en fonction de leur empreinte de méthylation. Le premier « C1 » dérivant d'une cellule B n'ayant pas expérimenté le centre germinatif, portant la translocation t(11 ;14) et présentant une absence ou un faible taux de d'hypermutation somatique de l'*IGHV*, acquière précocement des mutations génétiques et épigénétiques avec entre autre l'expression de SOX11 qui empêche ces cellules d'entrer dans le centre germinatif. Le deuxième « C2 » quant à lui, porte de même la translocation t(11 ;14), mais n'exprime pas SOX11, montre un fort taux d'hypermutation somatique et semble donc dériver de cellules B ayant expérimenté le centre germinatif. Les MCL « C2 » qui sont cliniquement indolents, ont peu de mutations génétiques tout comme de modifications épigénétiques tandis que ceux avec un profil plus agressif ont plus de mutations génétiques et modifications épigénétiques.<sup>30</sup> (figure 13)

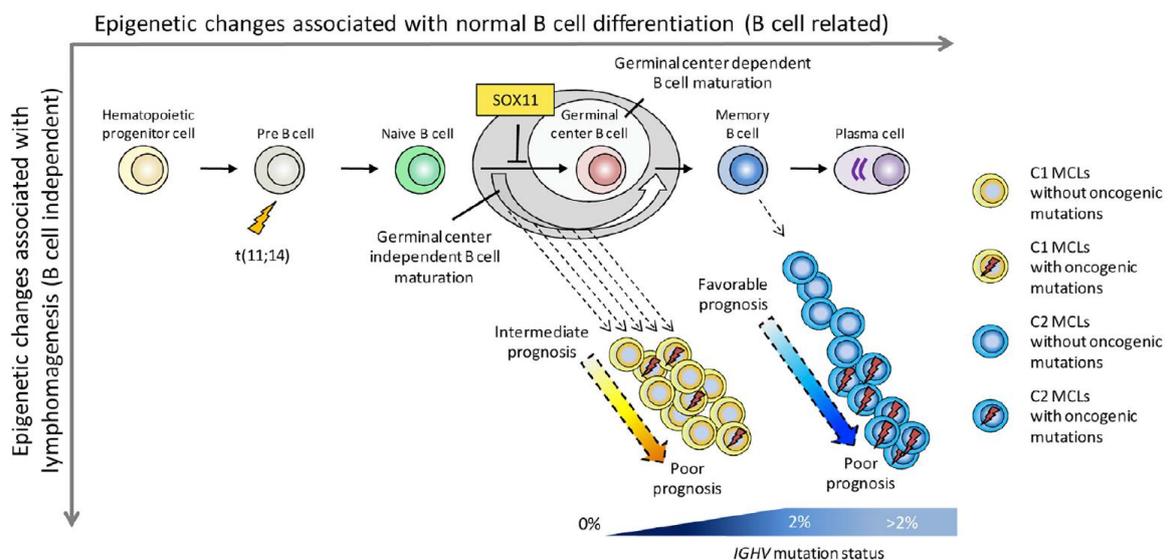


Figure 11. Modèle épigénétique de la pathogénèse du lymphome à cellules du manteau

## Partie 5 - Traitement

### 5.1 Index Pronostique

Bien que peu utilisé actuellement pour les décisions thérapeutiques, un index pronostique est utilisé afin de classer les patients en trois groupes (bas, intermédiaire, haut risque). Il s'agit du MIPI (Mantle cell Lymphoma International Pronostic Index) qui permet une estimation de la survie médiane<sup>31,32</sup>. Il est l'intégration de l'âge, du PS (Performance Status) via l'ECOG, du taux de lactate déshydrogénase et du compte de leucocytes. Ce score pronostique peut cependant faciliter les décisions de traitement chez les patients atteints de MCL à stade avancé.

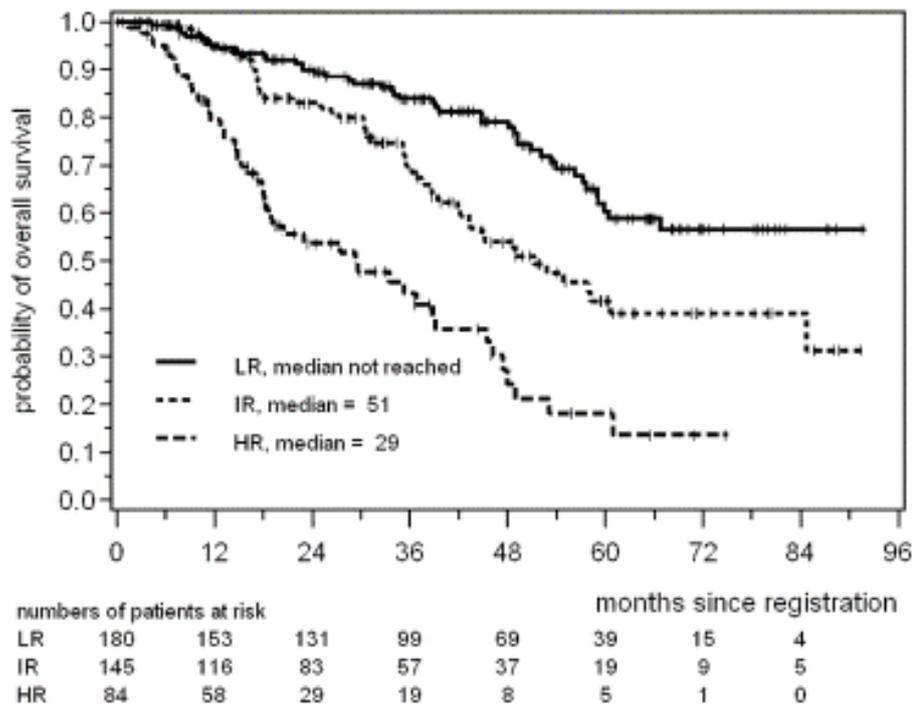
**Score MIPI** = [(0,03535 x âge [ans]) x âge [ans] + 0,6978 (si ECOG > 1) + [1,367 x log10 (LDH / lim. Sup. Nle)] + [0,9393 x log10 (leucocytes x 10<sup>6</sup>/L)]

Il existe un **MIPI simplifié** qui peut être résumé en un tableau :

Points	Age, y	ECOG	LDHULN	WBC, 10 <sup>6</sup> /L
0	< 50	0 – 1	< 0.67	< 6.700
1	50 – 59	---	0.67 – 0.99	6.700 – 9.999
2	60 – 69	2 - 4	1.000 – 1.49	10.000 – 14.999
3	> 70	---	>1.500	>15000

En fonction du nombre de point, le patient est alors affecté à groupe pronostic lié à une survie médiane pronostique. (**figure 14**)

Risque	Nombre de points	Survie médiane (mois)
Faible	0 – 3	> 60
Intermédiaire	4 – 5	58
Elevé	6 - 11	37



Hofter et al. Blood 2008

Figure 12. Survie globale pour les risques faibles, intermédiaires et élevé selon le score pronostic MIPI.

Les informations mutationnelles ainsi que les signatures moléculaires qui en découlent pourraient être en corrélation avec les réponses aux thérapies. Ainsi, une meilleure compréhension des mutations génétiques survenant lors du diagnostic et celles après traitement pourrait permettre d'adapter les traitements offrant l'occasion d'une « médecine personnalisée » pour les patients.

## 5.2 Les immunochimiothérapies de première ligne

Les stratégies thérapeutiques du MCL dépendent du stade Ann Arbor. Pour les stades 0 et 1, soit les MCL in situ, les formes indolentes ou très précoces, la stratégie « Wait and Watch » est adoptée puisqu'aucune preuve de supériorité n'a été démontrée dans le traitement de ces patients en terme de survie globale<sup>33</sup>. Pour les stades supérieurs, les stratégies sont basées sur l'âge et la condition physique du patient.

### **5.2.1 Patient de moins de 65 ans**

Le traitement de référence du sujet jeune en première ligne comporte une induction par une polychimiothérapie à base de cytarabine et de rituximab, suivie d'une intensification thérapeutique avec autogreffe<sup>34</sup>. Puis un traitement d'entretien par rituximab est assuré.<sup>35</sup>

### **5.2.2 Patient de plus de 65 ans**

Le traitement de référence en première ligne des sujets âgés consiste en huit cycles de R-CHOP21 avec un traitement de maintenance par rituximab.

Les chimiothérapies à base de bendamustine peuvent également représenter une alternative. Le VR-CAP (Velcade / rituximab / adriamycine / prédnisone / cyclophosphamide) est un exemple de poly chimiothérapie validée<sup>34</sup> et en cours d'exploration en association avec le velcade dans le groupe LYSA (Gressin, en préparation)

## **5.3 Les immunochimiothérapies de deuxième ligne**

D'autres molécules sont utilisées pour les traitements de seconde ligne et en voici quelques exemples non exhaustifs.

### **5.3.1 Le Temsirolimus**

C'est un analogue de la rapamycine, inhibiteur allostérique de mTorc1, qui va ainsi bloquer la voie PI3K/AKT/mTOR activée dans le MCL. Il est aussi homologué pour les lymphomes à cellules du manteau en rechute ou réfractaires.

L'association du temsirolimus, 25 mg par semaine, au rituximab (une perfusion hebdomadaire pendant le premier cycle, puis une perfusion mensuelle) améliore les taux de réponse.

### **5.3.2 L'Ibrutinib**

L'activation constitutive de la voie de signalisation médiée par le récepteur aux cellules B apparaît être essentielle pour la survie et prolifération des cellules B malignes. La tyrosine

kinase de Bruton s'avère être un composant essentiel de cette voie de signalisation et constitue donc une cible thérapeutique intéressante à inhiber. L'ibrutinib est un inhibiteur de cette kinase, se prend par voie orale et demeure indiqué dans les cas de MCL réfractaires ou en rechute<sup>36</sup>.

### **5.3.3 Le Bortézomib**

C'est un inhibiteur du protéasome très utilisé dans le traitement des myélomes multiples<sup>37</sup>. Il a démontré son efficacité dans les lymphomes à cellules du manteau en rechute ou réfractaires, ce qui a permis son homologation dans cette indication. Cependant, il est à noter une résistance de 30 à 50% des patients traités.

Les mécanismes d'action du bortézomib sont multiples. Son principal mode d'action réside dans l'inhibition du protéasome par liaison au site catalytique via la sous-unité 26S avec une haute affinité et spécificité.

## Arguments scientifiques

Le lymphome à cellules du manteau fait partie des lymphomes B diffus à petites cellules représentant 5% des lymphomes non Hodgkiniens<sup>11</sup>, avec un pronostic péjoratif, une évolution rapide et des rechutes itératives (médiane de survie 5-10 ans). Cette pathologie, qui touche préférentiellement les hommes (M/F 4 :1) a en France une prévalence estimée de 1/25000 et une incidence de 3/100000.

Biologiquement, le lymphome à cellules du manteau se distingue de part son immunophénotypage : CD19+, CD20+, CD5+, CD23- et CD10-. Le CD5, qui joue un rôle de régulateur négatif de la signalisation issue du BCR est caractéristique du lymphome à cellules du manteau. L'autre caractéristique majeure de ce lymphome est la translocation t(11;14)(q13;q32), responsable de la surexpression constitutive du gène de la cycline D1 par positionnement de ce gène sous le contrôle du promoteur des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines. Cependant, bien que précoce dans l'oncogénèse du lymphome du manteau, d'autres événements oncogéniques sont indispensables.

Les stratégies thérapeutiques sont diverses et dépendent de l'âge du patient ainsi que ses comorbidités. On peut par exemple citer l'utilisation de chimiothérapies à base de Cytarabine ou encore l'utilisation du Rituximab, anticorps monoclonal anti-CD20, associé à une plochimiothérapie (Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone) mais aussi les greffes de cellules souches hématopoïétiques (autogreffes ou allogreffes selon les cas) suivi d'un traitement d'entretien. Cette diversité illustre la difficulté à traiter qui résulte de l'hétérogénéité biologique de la pathologie. De fait, celle-ci progresse inéluctablement et les rechutes itératives sont de plus en plus fréquentes. Il existe donc un véritable challenge pour proposer aux cliniciens des outils pronostiques efficaces.

Le séquençage à haut débit tel que le séquençage nouvelle génération (NGS) permet d'identifier de manière globale les perturbations génétiques chez les patients et révolutionnent le domaine de la génétique, que ce soit par des approches sur génome ou des analyses plus ciblées (régions, exons etc.). Cet outil, en plus de donner une vue globale sur le paysage mutationnel d'une pathologie pourrait s'avérer fort utile pour suivre l'évolution des signatures moléculaires lors des rechutes et ainsi adapter les traitements en vue d'une meilleure réponse thérapeutique.

Plusieurs études, utilisant le NGS, ont permis d'établir ce paysage mutationnel dans le lymphome du manteau. 25 gènes significativement mutés de façon récurrente dans le lymphome à cellules du manteau ont été identifiés ; les plus fréquemment mutés étant ceux codant pour les protéines ataxia telangiectasia mutée ATM (41.4% ; 12/29), la cycline D1 (34.5% ; 10/29), le suppresseur de tumeur TP53 (31% ; 8/29), les méthyltransférases MLL2 (14% ; 4/29) et WHSC1 (14% ; 4/29), l'ubiquitine ligase BIRC3 (6% ; 3/29), le facteur de transcription MEF2B (3% ; 2/29) et le récepteur de type Toll, TLR2 (1% ; 2/29). D'autres mutations, plus rares (<1%), sont également décrites comme par exemple, les mutations au sein du gène codant le facteur de transcription LUZP4 (Leucine Zipper Protein 4), l'enzyme DCP1B (mRNA-decapping enzyme 1B) et la protéine SP140 (nuclear body protein)<sup>24</sup>

Récemment, l'implication de mutations au sein de gènes codant pour des facteurs impliqués dans la voie NFκB a été décrite, influençant la réponse à l'Ibrutinib et à la Sotrastaurine<sup>28</sup>.

Enfin, de nouvelles mutations ont été décrites au sein des gènes codant le régulateur chromatinien SMARCA4 (14.2% ; 8/56), les suppresseurs de tumeurs RB1 (10.7% ; 6/56) et DLC1 (9% ; 5/56), les cadhérines FAT4 (9% ; 5/56) et CDH8 (3.5% ; 2/56), les facteurs de transcriptions SALL3 (9% ; 5/56), ZNF296 (7.1% ; 4/56), ZNF117 (5.4% ; 3/56) et ESX1 (5.4% ; 3/56), de la protéine POT1 (5.4% ; 3/56) impliquée dans la protection des télomères,

de la kinase EIF2AK4 (5.4% ; 3/56), de la caténine CTNNA2 (5.4% ; 3/56), de la deshydrogénase OGDHL (5.4% ; 3/56) et de l'ATPase ATP11C (3.5% ; 2/56)<sup>27</sup>.

Dans ce contexte, ce travail de thèse a eu pour mission d'évaluer un panel NGS custom ciblant les gènes décrits comme fréquemment impliqués dans le lymphome à cellules du manteau. Panel ciblant 44 gènes (354 exons, 99.94 kb, 999 amplicons, 94,73% couverture) ayant, en particulier, un axe épigénétique (*CHD2*, *MLL2*, *MLL3*, *SMARCA4*, *TET2* et *WHSC1*) s'inscrivant dans les problématiques développées par notre équipe afin de mieux caractériser l'impact de mutations affectant ces régulateurs épigénétiques. L'évaluation s'est faite en séquençant 6 lignées cellulaires dérivées de lymphome à cellules du manteau ainsi que 30 patients atteints de lymphome du manteau en lien avec des essais clinique coordonnés par notre équipe et conduits au CHU de Grenoble.

En somme, il a pu être montré l'intérêt d'un outil prédictif, diagnostique et pronostique dans la prise en charge de patients ayant un lymphome à cellules du manteau.

## Résultats

### **Assessment of a targeted deep sequencing gene panel as a precision medicine tool in mantle cell lymphoma**

Sarah Bertrand<sup>1</sup>, Azadeh Hajmirza<sup>1</sup>, Arnaud Gauthier<sup>1</sup>, Céline Suchaud-Martin<sup>2</sup>, Samuel Duley<sup>1</sup>, Isabelle Putaud<sup>2</sup>, Martine Chauvet<sup>1,2</sup>, Sieme Hamaidia<sup>1,2</sup>, Cedric Arisdakessian<sup>1</sup>, Amandine Chatagnon<sup>2</sup>, Nicolas Thierry-Mieg<sup>3</sup>, Christine Lefebvre<sup>1,2</sup>, Marie-Christine Jacob<sup>1,2</sup>, Thierry Bonnefoix<sup>1,4</sup>, Steven Le Guill<sup>5</sup>, Remy Gressin<sup>1,6\*</sup>, Anouk Emadali<sup>1,4\*</sup>, Mary Callanan<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM Unit 1209, CNRS UMR 5309, Faculté de Médecine, Université Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, France

<sup>2</sup>Institut de biologie et de pathologie, CHU de Grenoble-Alpes, Grenoble, France

<sup>3</sup>CNRS UMR 5525, TIMC-IMAG/BCM, Faculté de Médecine, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

<sup>4</sup>Pôle Recherche, CHU de Grenoble-Alpes, Grenoble, France

<sup>5</sup>Service d'Hématologie Clinique, CHU de Nantes, Nantes, France

<sup>6</sup>Service d'Hématologie Clinique, CHU de Grenoble-Alpes, Grenoble, France

#### **Correspondence:**

Mary Callanan

E-mail: [mary.callanan@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:mary.callanan@univ-grenoble-alpes.fr)

Anouk Emadali

E mail : [anouk.emadali@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:anouk.emadali@univ-grenoble-alpes.fr)

Rémy Gressin

E-mail : [RGressin@chu-grenoble.fr](mailto:RGressin@chu-grenoble.fr)

Centre de Recherche – INSERM Unité 1209-CNRS UMR 5309 - Faculté de Médecine, Université

Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, Site Santé, IAB, BP 170 - La Tronche, 38042

GRENOBLE Cedex 9 – France.

Tel: +33 (0)4 76 54 95 84 ; Fax: +33 (0)4 76 54 94 25

## ABSTRACT

Mantle cell lymphoma (MCL) is a clinically aggressive disease for which molecular profiling-based precision medicine algorithms are lacking. Here, to address this issue we have designed and implemented a targeted deep sequencing gene panel covering 44 recurrently mutated genes in MCL. By studying a cohort of 30 patients (38 samples), we demonstrate the feasibility of our gene sequencing assay for defining mutation profiles from very small DNA quantities, in time frames compatible with clinical decision-making in MCL. Mutation frequencies largely comply with published cohorts of similar size. By studying a subgroup of refractory compared to long term remission patients who were enrolled in a LYSA phase II RiBVD (Rituximab, Bendamustine, Velcade and Dexamethasone) we identify mutations in *TP53*, *MLL2*, and *MEF2B* as characteristic of primary refractory disease. *TP53* mutation screening by targeted deep sequencing in a further 63 MCL cases (in the clonally involved blood samples and / or bone marrow) showed very short survival for *TP53* mutant cases compared to wildtype case. Gene expression profiling followed by unbiased functional annotation in *TP53* wildtype versus mutant MCL point to reduced cytotoxic immune function and gain of *NFKB* and a *MYC*-regulated core stem cell pathways, respectively, as potentially important biological processes underpinning *TP53*-driven treatment failure in MCL. Thus implementation of our targeted deep-sequencing gene panel is feasible and presents clear potential as a useful companion precision medicine tool for MCL patient management, and for discovery of novel disease mechanisms.

## INTRODUCTION

Mantle Cell Lymphoma (MCL) represents about 5% of non-Hodgkin lymphoma and is a clinically aggressive disease characterized by iterative clinical relapses that are increasingly difficult to treat by successive salvage therapies (4-5 years as median overall survival). Some patients do however survive greater than 10 years after initial diagnosis (1). There is thus considerable interest in defining molecular markers to guide precision medicine approaches in the care of patients with mantle cell lymphoma.

Biologically, MCL is characterized by clonal expansion of malignant B cells that show a distinctive immunophenotype (CD5+, CD10-, CD23-) and that harbor the chromosomal translocation t(11;14)(q13;q32) which drives illegitimate expression of the G1 cyclin gene, *CCND1*. Numerous additional copy number gains or losses mostly affecting cell cycle regulatory and proliferation genes or genes encoding DNA repair factors (ATM, TP53) (2, 3). More recently, whole genome / exome and RNA sequencing efforts have revealed complex patterns of gene mutations affecting known and novel gene targets in MCL. These mutations target numerous proteins including *CCND1* itself, transcription factors (MEF2B and NOTCH1/2), members of the TRAF3/MAP3K14-TRAF2/BIRC3-negative regulatory complex of noncanonical NF- $\kappa$ B signaling, ubiquitin signaling factors (UBR5) and epigenetic modifiers such as MLL2, MLL3 and TET2 (4-8).

A characteristic of the mutational landscapes described thus far in MCL is the relatively low frequency of individual gene mutations across the studied patient cohorts (many mutations are observed in ~10 % or less of patients) (4-8). Of the genes identified none can be considered as specific to MCL and information concerning the clinical pertinence of the described mutations is lacking. In this context we set out to design, implement and test a targeted deep sequencing gene panel for use in the clinical setting in MCL. We demonstrate the feasibility of this gene panel for defining mutational signatures in MCL at diagnosis, during disease progression / relapse after bone marrow transplantation (BMT) or in *de novo* treatment refractory MCL.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **MCL patient samples**

MCL patients were recruited retrospectively between 1997 and 2016 through the Grenoble University Hospital lymphoma bank or were selected for analysis from the LYSA tumour bank for the RiBVD phase II trial, coordinated by the French Lymphoma Study Association (LYSA). Following review of clinical and biological criteria for MCL diagnosis, and on the basis of available histologic data, DNA and RNA samples and access to clinical and cytogenetic data, 30 patients were enrolled in the initial MCL gene panel testing phase (Table S2). A further 65 patients underwent targeted deep sequencing of the entire *TP53* locus. All patients provided written informed consent. The study was approved by Grenoble Hospital institutional review board and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Genomic DNA from MCL patients and healthy peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were extracted either using standard procedures, as described.

### **MCL cell lines**

The human MCL-derived cell lines (Hbl-2, Jeko-1, JVM-2, Maver-1, Mino and Rec-1) were grown in RPMI 1640 and 25mM HEPES (Gibco), supplemented with 2mM L-glutamine (Gibco) and 100µg/ml Penicillin/Streptomycin solutions (Gibco) and 10% (Hbl-2, JVM-2 and Rec-1) or 20% (Jeko-1, Maver-1, Mino) of fetal bovine serum (FBS) (Biowest). Hbl-2 was also supplemented with 1mM sodium pyruvate (Gibco), non-essential amino acids (Gibco) and vitamins (Gibco). Granta-519 cells were grown in DMEM and 25mM HEPES (Gibco), supplemented with 10% FBS (Biowest), 4.5g/L glucose (Gibco) and 100µg/ml Penicillin/Streptomycin solutions (Gibco).

### **Targeted deep sequencing gene panel for MCL**

The chosen sequencing platform was the Ion Torrent PGM, using Ampliseq library sequencing. For MCL target gene selection, 6 massively parallel sequencing studies (totalling 574 patients) (Table S1) were curated to identify recurring gene mutations in MCL.

By applying frequency criteria (10%) and by using manual inspection of the COSMIC data base, a list of 45 genes that showed recurrent mutation in MCL and / or potential biological significance for MCL pathogenesis were selected for the design of Ampliseq sequencing library primers by using the Ampliseq Designer software. The target sequencing depth was 500X. The gene sequencing assay primers were thus pooled in two tubes. Design was optimized so that known mutation hotspot clusters localized where possible to the central region of amplicons. The resulting MCL custom AmpliSeq gene covered a total size of 99.94 kb and included 999 amplicons targeting 341 (mostly exonic) regions from 44 of the 47 selected genes (Table S3, for *NOTCH1/2* and *hTERT* promoter region, the Ampliseq design failed). The overall theoretical coverage rate was 94.73% although certain sites [*ATM* exon 49 (L2427); *ESX1* exon 4 (P323T, R329P, G369R); *TLR2* exon 3 (S298Y); *ZNF296* exon 3 (S189\*, E190K)] could not be covered by sequencing amplicons. *NOTCH1* mutations were scored manually using Sanger sequencing. *hTERT* and *NOTCH2* mutation screening was not performed in this study. An additional 3 genes of interest for differential or comparative diagnosis with other small lymphocytic lymphoma (*MYD88*) or B-cell chronic lymphocytic leukemia (*SF3B1*) or resistance to BTK inhibitors (BTK) were also included.

### **Targeted gene panel and Sanger sequencing**

Ion Ampliseq DNA libraries were prepared using 2 x 10 ng of genomic DNA (for a list of the cases studied and the tissue source of DNA, see Table S2) in two reactions using primers pools of 504 and 495 amplicon primer pairs respectively. Libraries were submitted to emulsion polymerase chain reaction (PCR) with the Ion PGM Hi-Q OneTouch 2 template kit v2. The generated ion sphere particles were enriched with the Ion OneTouch Enrichment System, loaded, and sequenced with the Ion PGM Hi-Q Sequencing 200 Kit on Ion 316 v2 chips (Thermo Fisher Scientific). Torrent Suite version 5.0 software (Thermo Fisher Scientific) was used to perform primary analysis, including signal processing, base calling, sequence alignment to the reference genome (hg19), and generation of binary alignment/map files. Binary alignment/map files were used by Torrent Suite Variant Caller to detect point mutations and short indels using the PGM Somatic Low Stringency profile.

Variant Call Format files generated by Variant Caller were annotated using Variant Effect Predictor. Samples were considered of sufficient quality when >90% of targeted bases were read with a base call accuracy of at least Q20. The average sequencing depth was 471X. Variants present in single nucleotide polymorphism databases and absent in COSMIC (version 64) were discarded, as were variants with a predictive SIFT (sorting intolerant from tolerant) score >0.05. DNA libraries were generated using Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher) according to manufacturer's recommendations. Likewise variants that were detected in the normal control pooled DNA were flagged as artefact false positives and subtracted from the final somatic variant list in MCL lines and clinical samples. Sanger sequencing of the *NOTCH1* locus was performed by standard methods using primers and PCR conditions, as described (5). Purified PCR products were directly sequenced in both directions, using BigDye Terminator Mix (Applied Biosystems), on the Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer. Data were analyzed with the SeqScanner software version 1.0 (Applied Biosystems).

### **Gene expression profiling**

Affymetrix GEP was performed as described previously by using total RNA and Affymetrix U133 2.0 chips. GEP data normalization and gene set enrichment analysis (GSEA) were performed as described previously (9).

### **Statistical methods**

Excel 2010 (Microsoft), JMP 10.0.0 (SAS Institute), Stata/IC 10.1 (StataCorp), and GraphPad (Prism) software programs were used for graphical representations and to perform statistical analysis across all experiments. Survival curves were built according to the Kaplan-Meier method. Comparison of Kaplan-Meier survival estimates was performed using the log-rank test. Univariate and multivariate survival analyses were performed using Cox proportional hazards regression to identify statistically significant predictors of overall survival and to obtain hazard ratio estimates as well as corresponding 95% confidence intervals.

## RESULTS

### Implementation and testing of the targeting deep-sequencing gene panel for MCL

As a first step to testing our MCL gene panel, we performed targeted deep sequencing in 6 MCL cell lines (Granta 519, Hbl, Jeko-1, Maver-1, Mino, Rec-1) compared to a pool of 5 normal donor PBMC samples, in two independent sequencing runs. This showed high quality, reproducible sequence reads, at acceptable sequencing depth for the majority of target amplicons. Importantly the expected mutation profiles for the MCL cell lines tested were observed (Fig.1B). These were *ATM* mutations in Granta, Mino and Rec-1, as expected and *TP53* mutations in all cell lines except Granta. Additional mutations were in the *RB1* (Jeko-1), *SMARCA4* (Maver-1), *MLL3* (Jeko-1), and *MEF2B* genes (Rec-1), as described in published series (Fig. 1B, left panel and Table S2) (5, 8). We next screened 22 primary MCL cases treated at our center (including respectively, 18 classical, 3 pleomorphic, 1 blastoid variant case, and 1 case of **in situ mantle cell neoplasia** (ISM CN) (formerly, MCL in situ) (10). Of these 22 cases, 17 (77%) showed at least 1 somatically gene (range 1 to 3 mutations, per case) (Fig. 1B). Three cases (1 case each of classical, ISM CN and pleomorphic variant MCL, respectively) showed no mutations in any of the genes tested, despite having proven high tumor cell content and / or simple or complex karyotypes showing the t(11;14)(q11;q32) (Fig. 1B, and data not shown). In contrast, one case of classical variant MCL (VER Pi) with an isolated t(11;14)(q13;q32) showed mutations in 3 genes (*CCND1*, *RB1* and *CHD2*, respectively).

As expected from published reports, *ATM*, encoding the ataxia-telangiectasia mutated kinase, involved in DNA double strand break and replicative stress responses, was the most frequently mutated gene in our series (over 50% of cases). Mutations occurred throughout the gene, except that no mutations were observed in the regulatory FAT (named after FRAP-ATM-TRRAP) domain of the ATM kinase, in our series which is in contrast to published series (Fig. S1A). *TP53* mutations were identified in approximately 10% of our cases (3/22), again as expected.

*CCND1* mutations were more frequent in our series (20% of cases compared to approximately 10% in published series, Table S1) and occurred predominantly MCL patients

with pleomorphic variant (2 of 3 *CCND1*-mutated cases) in our series. *CCND1* mutations were associated with *ATM*, *TP53*, *RB1*, *LUZP4* or *CDH2* mutations singly or in combination but were not observed with mutations in genes from other functional classes (epigenetic regulation - with the exception of *CDH2* which encodes chromodomain helicase 2 – ubiquitin or NFκB signaling).

Mutations affecting chromatin modifier genes were observed in 7/22 cases with mutations in the *SMARCA4*, *WHSC1* and *MLL2* genes being observed in association with *ATM* mutations while *MLL3* and *CHD2* mutations were seen in our MCL cases, in the absence of *ATM* mutations.

Interestingly, one MCL case (BOC Ja, diagnosed with blastoid variant MCL) displayed a *KLF2* p.S287W missense mutation (VAF 58%). Although *KLF2* mutations have been described in splenic marginal zone B cell lymphoma (SMZL) and in rare MCL cases, their pathological role outside of SMZL is not well understood. The mutation observed here is novel in MCL. In reporter assays, it has been shown to be loss of function mutation that affects a highly conserved serine residue in the *KLF2* ZF1 domain and that results in uncontrolled NFκB signaling (11).

### **Gene panel-based mutation profiling identifies a central role for TP53 and epigenetic modifiers in relapsing and treatment refractory MCL.**

We next wished to establish the utility of our targeted deep sequencing gene panel for the detection of treatment resistance mutations in MCL. For this we selected 5 MCL cases which either relapsed (2) or showed primary refractory (3) disease in the immuno-chemotherapy setting, and for which DNA for at least one sample at the time of treatment resistance was available for analysis. In 2 of these 5 MCL cases, sequential samples were available for gene panel sequencing prior to initial therapy and upon relapse from subsequent salvage therapies post BMT transplantation (Fig. 2A, left and right panels, respectively; BER Ra and FRA Mi). In the first case (BER Ra) lymph node-derived tumor DNA samples obtained prior to and at the time of relapse 9 years after autologous bone marrow transplantation, were sequenced (Fig. 2A, left panel). The initial tumor showed a missense mutation in *ATM* (most likely clonal ; 63% VAF ; *ATM* p.R1917S) together an *MLL3* mutation affecting amino acid

residue p.A1685S (sub-clonal ; VAF 2%). At relapse, the same mutations were detectable, thus establishing clonal identity between the initial and very late relapse tumor clones and indicating a linear pattern of tumor evolution in this case. Of note, this patient did not receive maintenance therapy.

In the second case (FRA Mi), sequential gene panel monitoring was performed prior to treatment and following relapse from autologous and subsequently allogeneic bone marrow transplantation (Fig. 2A, right panel). A TRAF3 p.N517Qfs33 frameshift mutation that was present at diagnosis was detectable in the bone marrow and blood samples, respectively, at the time of relapse from autologous and allogeneic stem cell transplantation, respectively (8 year interval in total between diagnosis and relapse from allo-BMT) (Fig. 2A, right panel). In this case, however, a missense TP53 p.K132R, that was not detectable at earlier time points, was observed in the peripheral blood at relapse from allogeneic bone marrow transplantation, indicative of branched clonal evolution from a founder clone with *TRAF3* mutation during disease evolution in this patient. This TP53 p.K132R mutation is likely to co-exist with the TRAF3 mutation in the same cell since both mutations are detectable at equivalent % VAF (around 20%).

In a third case that was refractory to initial therapy by the RiBVD regimen, sequential monitoring by gene panel sequencing was performed prior to therapy and upon relapse or suboptimal response to multiple salvage therapies thereafter, including splenectomy, R-DHA-T (Temsorilimus), and ibrutinib therapy (Fig. 2B). Targeted deep sequencing in this case was performed in 5 consecutive blood samples. Initial gene panel mutation screening identified non synonymous mutations in TP53 and the NFKB pathway regulator MAP3K14, in addition to two synonymous mutations (DLC1, BIRC2 gene mutations) which we retained for their use as clonal markers. Following failure of RiBVD this patient went on to receive the R-DHA-T (temsirrolimus regimen) followed by rituximab alone and Ibrutinib monotherapy. While this strategy achieved regression of the TP53 mutant clone, as judged by reduced mutant allele burden over time, tumour escape occurred on ibrutinib with rebound of the TP53 mutant clone originally detected at diagnosis and following non response to R-DHA-T (interestingly the DLC1 mutant clone did not reappear). This patient subsequently died of disease, thus

underscoring the highly aggressive phenotype of TP53 mutant MCL clones. An unusual finding in this case was the persistence of the both the *MAP3K14* and *BIRC2* mutations throughout the monitoring phase, suggesting that these somatic mutations may be present in an independent clone that is not contributing directly to clinically-manifest disease in this patient.

In view of the findings above, we next wished to extend our targeted deep sequencing analysis to primary refractory versus long term responder patients. We chose to do this initially in a small subgroup of patients treated in a phase II trial by the French Lymphoma Study Association investigating the efficacy of the RiBVD regimen for first line treatment of elderly MCL patients (without maintenance) (Fig. 3A). This was of interest to us, because TP53 mutation status has not been assessed for clinical impact in the setting of combination therapy with proteasome inhibitors in MCL. We determined the mutation profiles in the pre-treatment peripheral blood of three MCL cases with early refractory disease compared to those of 5 patients with long term molecular and clinical remission in the RiBVD trial (more than 36 months). Quite strikingly, 3 of 3 refractory cases (including LEV Fr discussed above) showed TP53 mutations compared to 0/5 TP53 mutant cases in the 5 RiBVD 'long-responder' MCL cases. Additional mutations in the refractory cases targeted the MLL2, MEF2B and MAP3K14 genes (although as discussed above, the MAP3K14 mutation, albeit deleterious, may not involve the clinically relevant clone in this instance). In sharp contrast, the RiBVD-sensitive cases showed mutations in *ATM*, *TET2* and *TLR2*. Taken together this implicates TP53 and transcription factor / epigenetic signaling pathways in *de novo* resistance to RiBVD therapy in MCL. In view of our initial goal to evaluate gene panel sequencing to derive molecular markers for precision oncology in MCL, and keeping in mind the role of TP53 in our primary refractory and linear and branched clonal evolution events leading to late relapse in the transplant setting (5 / 11 cases in total), we assessed TP53 mutation by targeted re-sequencing in the whole cohort of the RiBVD trial in a single gene assay (69 patients). TP53 mutation conferred inferior overall and progression free survival in this homogeneously-treated patient cohort (Fig. 3B), suggesting that bendamustine combined

with proteasome inhibitors does not overcome the poor prognostic impact of TP53 mutation in MCL, as observed in high dose cytarabine-based regimens in MCL (2).

### **TP53 mutation identifies a novel subgroup of MCL characterized by non-canonical NFKB, MYC and alternative DNA damage repair signaling pathways.**

We next asked what biological pathways might be enriched in TP53 mutant versus wildtype cases. For this we performed gene expression profiling across 17 of our initial 22 MCL patients (14 TP53 wild type compared to 3 TP53 mutant MCL cases) coupled to Gene Set Enrichment Analysis to identify pathways that are differentially enriched between these two genetically defined subgroups. This approach identified numerous differentially expressed genes involved in diverse signaling pathways between TP53 wild type and mutant MCL. Of note, TP53 wild type compared to mutant MCL tumors were significantly enriched for a MYC-CCND1 neoplastic transformation network as well as cytotoxic T cell and IRF4-dependent gene expression programs (Fig. 3C near right panel). By contrast, TP53 mutant MCL were enriched for DNA repair pathways centering on BRCA proteins, alternative NFKB signaling and a MYC core networks, the latter of which is implicated in sustaining embryonic stem-like activity in aggressive blood and solid cancers (Fig. 3C far right panel).

## **DISCUSSION**

In this study, we set out to assess the feasibility and clinical utility of performing targeted deep sequencing of recurrently mutated genes for mutation profiling prior to, during and post treatment in MCL. Based on strict criteria, we designed a 44 gene MCL panel to which we added an additional 3 genes for their potential interest for differential diagnostic purposes with other small lymphocytic lymphoma / B-cell chronic lymphocytic leukemia (*MYD88*, *SF3B1*)(10) or for predicting treatment resistance (*BTK*) (12). We could show the overall feasibility and clinical interest of this deep sequencing gene panel, even if *NOTCH1* mutations had to be sequenced separately because of design failure in our AmpliSeq assay. Our gene panel uncovered mutations in the selected genes at the expected frequencies. It

should be noted that a sizable number of genes in our panel did not show mutations in our MCL study cohort.

Mutations of keen interest were those affecting ATM and TP53 for their high frequency (ATM) and implication in multiple modes of treatment resistance and failure in our study. Loss of function mutations in TP53 and ATM, both involved with DNA repair, are adverse prognostic indicators, in a variety of lymphoid malignancies. It is reasonable to propose that TP53 mutation profiling prior will be of use for risk stratification and precision oncology in MCL. In this work we implicate, for the first time, TP53 mutations and epigenetic / TF activity in poor response to proteasome inhibitor-based immune-chemotherapy (RiBVD). Even if performed in only a few cases, late relapse from auto or allo-BMT also appears to implicate TP53 mutation. Our study indicates that combining mutation scoring and gene expression profiling can offer insights to disease resistance mechanisms. For example, increased reliance on alternative DNA repair pathways in TP53 mutant MCL cells might render these sensitive to inhibitors acting on these pathways, as in solid tumours (PARP inhibitors, for example). Likewise, dependency on a MYC-driven stem cell programs or escape from immune surveillance raises the possibility that targeting MYC or immune checkpoints might be good therapeutic strategies in TP53-mutant MCL. More detailed functional screens are warranted to test these hypotheses, at least pre-clinically.

Mutations in epigenetic signaling factor-encoding genes were observed in a total of 9 / 30 of our MCL cases (30% ; *SMARCA4*, *WHSC1*, *MLL2*, *MLL3*, *CHD2* and *TET2* mutations). The genes targeted by mutation all encode factors that regulate complex interconnecting epigenetic signaling networks involving chromatin remodeling during differentiation and DNA damage, or that mediate histone modifications involved in genome wide control of orderly gene transcription / enhancer activity (13). Although our series is relatively small, mutation profiling implicates at least MLL2 and MLL3 dysfunction in MCL treatment resistance or relapse.

Of note the *CHD2* gene, also mutated in B-CLL, was seen in one MCL case with an isolated t(11;14)(q13;q32) and *RB1* and *CCND1* mutations. The high VAF was suggestive of this mutation occurring secondary to the t(11;14) but prior to the additional mutations,

suggestive of a potential driver role in MCL. The functional roles of CHD2, a member of the CHD family of SNF2 adenosine triphosphate (ATP)–dependent chromatin remodelers, are increasingly well defined at the chromatin level. Homozygous *Chd2* mutant mice show embryonic growth delay and perinatal lethality, and heterozygous animals undergo reduced neonatal viability and decreased life span. *Chd2* heterozygous mutants die because of multiple lymphomas and lymphoid hyperplasias supporting *CHD2* as a candidate driver gene in hematologic malignancies, including MCL (14, 15).

MCL risk stratification currently relies on clinical parameters and increasingly treatment response criteria rely on both clinical and minimal residual disease response rates. Maintenance therapy for younger patients having received auto-BMT is set to become the standard of care (Le Gouill, S et al, accepted NEJM, 2017). It is now desirable to move beyond the MIPI and MRD criteria towards a more molecular based risk score. While this may prove challenging given the low frequency of many recurrent mutations in MCL, our work suggests that such approaches are at the least technically feasible. Efforts in this direction are already underway in other lymphoma types. The Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) recently proposed a combined follicular lymphoma (FL) risk model called m7-FLIPI based on the mutation status of 7 genes (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP*, and *CARD11*) and the performance status according to the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) (16). The m7-FLIPI model stratifies patients into high-risk and low-risk groups, which in retrospective analysis showed improved prognostication compared with FLIPI alone. Design of similar molecular-based algorithms incorporating if possible gene expression signatures are important goals for the future management of MCL.

### **Acknowledgements**

Mary B. Callanan acknowledges research support from the l'INCa 'épigénétique et cancer' program (2014–2017) and institutional support from Grenoble and Dijon University hospitals, Université Grenoble-Alpes, Université Bourgogne-Franche Comté, INSERM, and CNRS. Sarah Bertrand received doctoral funding from the French ministry for higher education and research. Arnaud Gauthier was supported by the Auvergne-Rhone-Alpes region, under the

program 'Année Recherche' (Masters 2 research training at Bart's Cancer Institute, Jude Fitzgibbon). Azadeh Hajmirza has been the recipient of doctoral funding from the Société Française d'Hématologie. Additional support was from Janssen-Cilag and Mundipharma..

## BIBLIOGRAPHY

1. P. Jares, D. Colomer, E. Campo, Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *The Journal of clinical investigation* **122**, 3416 (Oct, 2012).
2. M. H. Delfau-Larue *et al.*, High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma. *Blood* **126**, 604 (Jul 30, 2015).
3. E. M. Hartmann *et al.*, Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* **116**, 953 (Aug 12, 2010).
4. B. Meissner *et al.*, The E3 ubiquitin ligase UBR5 is recurrently mutated in mantle cell lymphoma. *Blood* **121**, 3161 (Apr 18, 2013).
5. R. Kridel *et al.*, Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood* **119**, 1963 (Mar 1, 2012).
6. J. Zhang *et al.*, The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells. *Blood* **123**, 2988 (May 8, 2014).
7. R. Rahal *et al.*, Pharmacological and genomic profiling identifies NF-kappaB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nature medicine* **20**, 87 (Jan, 2014).
8. S. Bea *et al.*, Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 18250 (Nov 5, 2013).
9. A. Emadali *et al.*, Haploinsufficiency for NR3C1, the gene encoding the glucocorticoid receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms. *Blood* **127**, 3040 (Jun 16, 2016).
10. S. H. Swerdlow *et al.*, The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375 (May 19, 2016).
11. A. Clipson *et al.*, KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype. *Leukemia* **29**, 1177 (May, 2015).
12. D. Chiron *et al.*, Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer discovery* **4**, 1022 (Sep, 2014).
13. M. A. Dawson, The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities. *Science* **355**, 1147 (Mar 17, 2017).
14. P. Nagarajan *et al.*, Role of chromodomain helicase DNA-binding protein 2 in DNA damage response signaling and tumorigenesis. *Oncogene* **28**, 1053 (Feb 26, 2009).
15. D. Rodriguez *et al.*, Mutations in CHD2 cause defective association with active chromatin in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **126**, 195 (Jul 09, 2015).
16. A. Pastore *et al.*, Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *The Lancet. Oncology* **16**, 1111 (Sep, 2015).

## FIGURE LEGENDS :

### Figure 1: Targeted deep-sequencing gene panel for MCL

**A.** Design strategy for the selection of genes included in MCL custom panel. \* 3 genes added *SF3B1* and *MYD88* (differential diagnosis with other small lymphocytic lymphoma) and *BTK* for ibrutinib resistance screening. **B.** Heatmap depicting the somatic mutation pattern identified in 6 MCL cell lines and 22 MCL cases (diagnosis samples). Each row represents a gene and each column represents a primary tumor/cell line. Vertical bar graph show the frequency of somatic mutations for each gene in our study (blue bars) and in a meta-analysis of main NGS published studies in MCL (grey bars). Biological function associated with mutated genes are represented on the left.

### Figure 2: Gene panel-based mutation profiling identifies a central role for TP53 and epigenetic modifiers in relapsing and treatment refractory MCL.

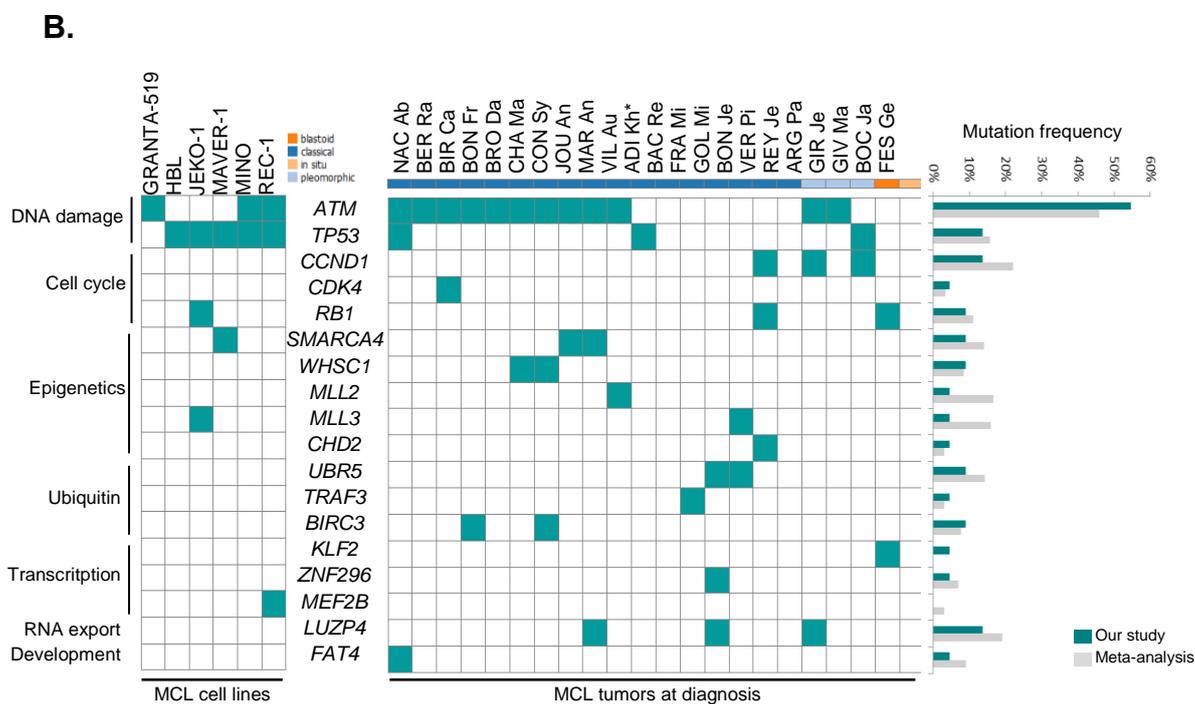
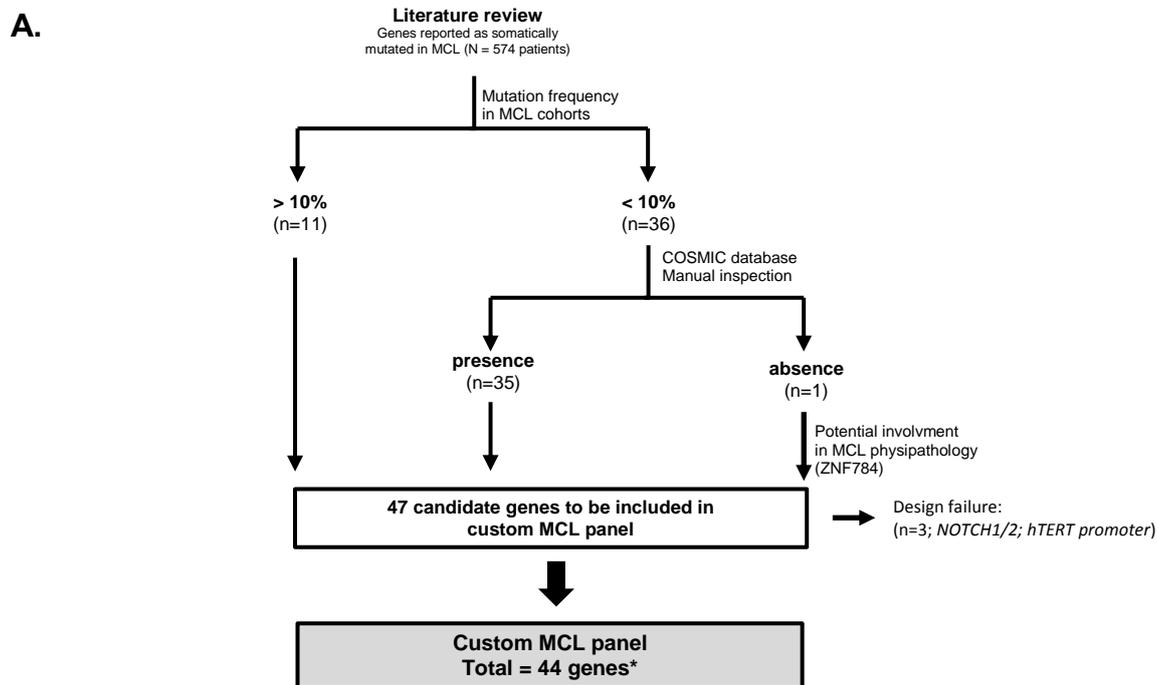
Longitudinal follow-up for patients BER Ra, FRA Mi (**A**) and LEV Fr (**B**). Schematic representation of the clinical evolution of the disease (upper panel). IGV screenshots depicting the mutated regions for each follow-up sample (lower panel). Sequencing depth and VAF (variant allele frequency) are given for each variant. **B.** Heatmap depicting the mutation pattern for the 5 samples analyzed (lower panel, left). Evolution of the VAF for each variant during disease evolution (lower panel, right).

### Figure 3: TP53 mutation identifies a novel subgroup of MCL characterized by non-canonical NFKB, MYC and alternative DNA damage repair signaling pathways.

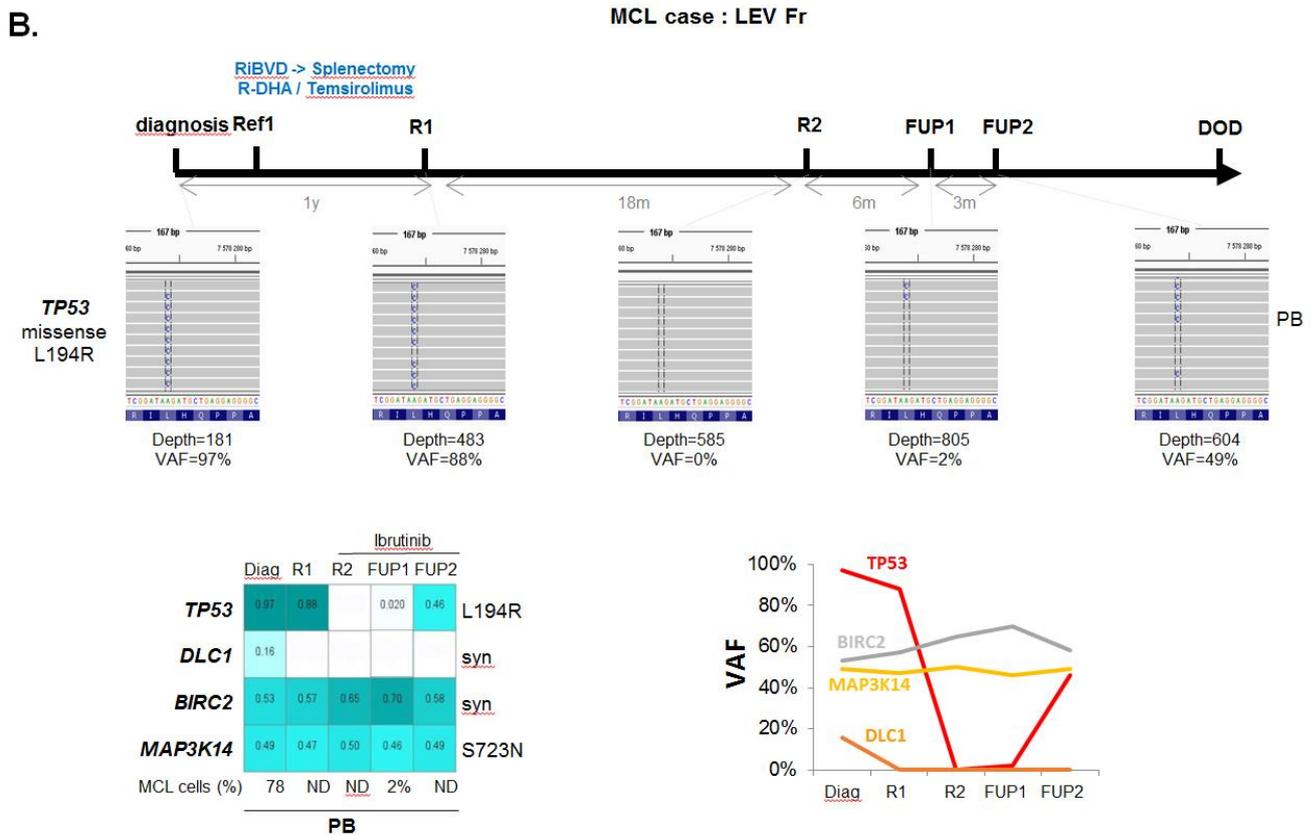
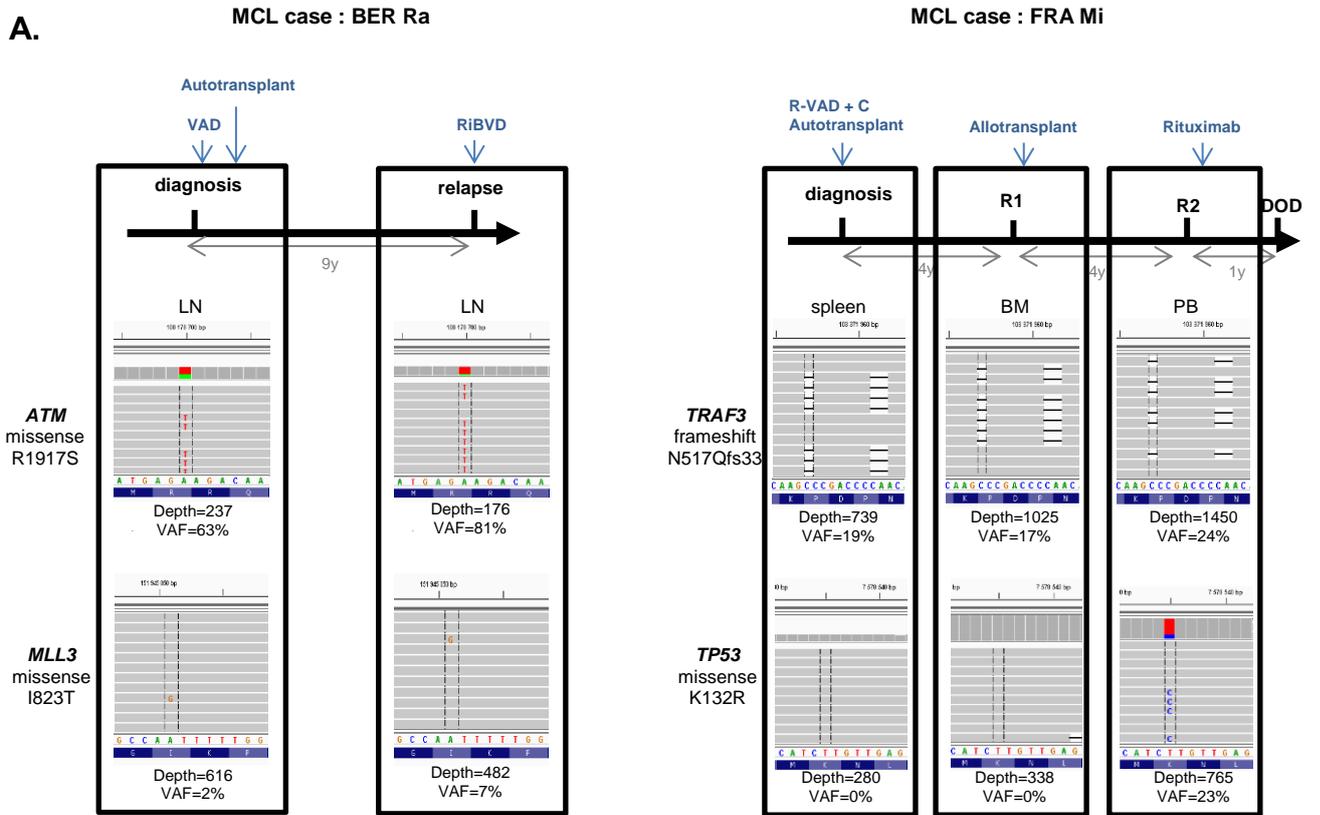
**A.** Heatmap depicting the somatic mutation patterns identified in 8 MCL RIBVD cases (3 primary refractory and 5 sensitive 'long term responders', as indicated). **B.** Kaplan–Meier cumulative survival curves depicting overall (upper panel) and progression free (lower panel) survival between *TP53* wt and *TP53* mut cases, p values from log-rank test. **C.** Schematic representation of the position of somatic variants identified in this study on *TP53* protein (upper left panel) ; Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) enrichment plots obtained from gene expression data from *TP53* wt and *TP53* mut cases (right panel) and associated heatmap (lower, left panel).

**Figure S1: Distribution of mutations in ATM and CCND1 in MCL.**

**A.** Distribution of *ATM* mutations in our MCL series (above *ATM* protein map) compared to previously described *ATM* mutations in MCL (below the *ATM* protein map, Bea et al, PNAS 2013). **B.** Distribution of *CCND1* mutations in MCL in the present study (above the *CCND1* protein map) compared to previously described *CCND1* mutations in MCL (Kridel et al; Blood, 2012, *Beà et al; PNAS, 2013, Meissner et al; Blood, 2013*). Green circles : missense mutations. All *CCND1* mutations (E35, Y44 and C47) reported in the present study were previously described.



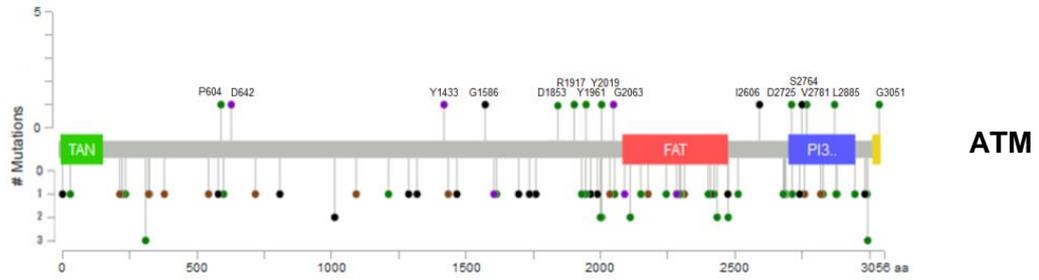
**Figure 1**



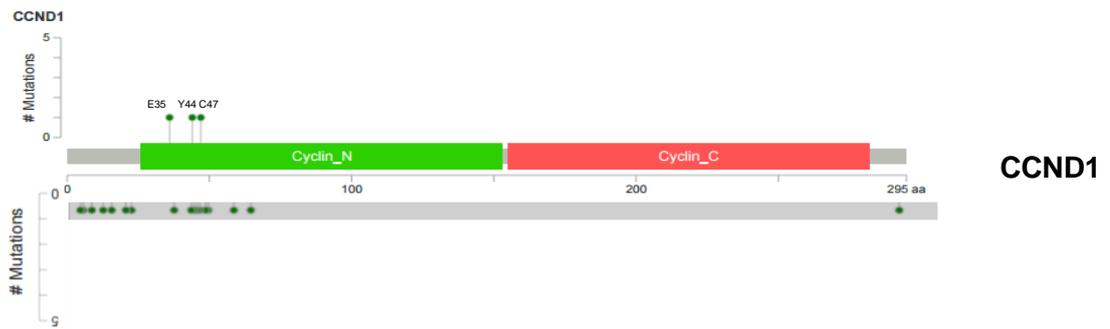
**Figure 2**



**A.**

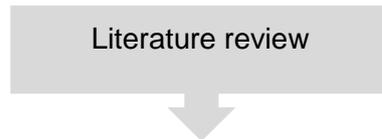


**B.**



**Figure S1**

**Table S1: Metanalysis of NGS mutational profiling studies in MCL**



References	MCL cohort	# lymph nodes	# blood	# tissues	# gene mutations
Bea et al, PNAS, 2013	n=29	12	23	1 tonsil 1 colon 1 spleen	25
Zhang et al, Blood, 2014	n= 56	48	none	2 tonsil 5 spleen 1 stomach	37
Rahal et al, Nature medicine, 2014	n= 165 meta				8
Kridel et al, Blood, 2013	n= 108	n/a	n/a	n/a	2
Meissner et al, Blood, 2014	n= 102	n/a	n/a	n/a	5
Baumann et al, Nature medicine, 2014	n = 114		FFPE tissue		2
TOTAL	n=574				n=70

**Table S2: Patient clinical data and mutation profiles obtained by targeted deep sequencing with the MCL gene panel**

UPN	Patient name	Age (y) /sex	Histological subtype	Initial therapy	Source of DNA for NGS	Mutation (s)
1	BON Fr	48 / M	classical MCL	-	Spleen	<b>ATM</b> : c.6975+13dupT, (VAF: 95%); <b>BIRC3</b> : c.1619C>G, p.Ser540Ter, (VAF: 48%)
2	VIL Au	71 / M	classical MCL	-	LN	<b>ATM</b> : c.6056A>G, p.Tyr2019Cys, (VAF: 47%); <b>ATM</b> : c.8292_8293delTG, p.Ser2764ArgfsTer4, (VAF: 40%); <b>MLL2</b> : c.15784+3G>C, (VAF: 43%); <b>TP53</b> : c.747G>T, p.Arg249Ser, (VAF: 91%)
3	GIR Je	60 / M	pleomorphic MCL	R-DHAP/ASCT	LN	<b>ATM</b> : c.5558A>T, p.Asp1853Val, (VAF: 39%); <b>ATM</b> : c.5558A>T, p.Asp1853Val, (VAF: 34%); <b>TNFAIP3</b> : c.380T>G, p.Phe127Cys, (VAF: 7%); <b>TP53</b> : c.747G>T, p.Arg249Ser, (VAF: 91%)
4	NAC Ab	51 / M	classical MCL	-	LN	<b>ATM</b> : c.1810C>T, p.Pro604Ser, (VAF: 53%); <b>FAT4</b> : c.6460T>C, p.Phe2154Leu, (VAF: 46%); <b>TP53</b> : c.659A>G, p.Tyr220Cys, (VAF: 94%)
5	ARG Pa	75 / M	pleomorphic MCL	-	LN	<b>ATM</b> : c.5882A>G, p.Tyr1961Cys, (VAF: 87%); <b>CCND1</b> : c.131A>T, p.Tyr44Phe, (VAF: 46%); <b>LUZP4</b> : c.812G>A, p.Arg271Lys, (VAF: 28%)
6	MAR An	79 / M	classical MCL	-	LN	<b>ATM</b> : c.7816delA, p.Ile2606TyrfsTer25, (VAF: 8%); <b>ATM</b> : c.8174A>T, p.Asp2725Val, (VAF: 19%); <b>LUZP4</b> : c.791G>A, p.Arg264Lys, (VAF: 18%); <b>SMARCA4</b> : c.3575G>A, p.Arg1192His, (VAF: 10%)
7	CON Sy	45 / M	classical MCL	-	LN	<b>ATM</b> : c.1924G>T, p.Glu642Ter, (VAF: 45%); <b>BIRC3</b> : c.1261_1264delCTCA, p.Leu421MetfsTer6, (VAF: 20%); <b>BIRC3</b> : c.1284_1285dupGG, p.Glu429GlyfsTer19, (VAF: 10%); <b>WHSC1</b> : c.3295G>A, p.Glu1099Lys, (VAF: 31%)
8	JOU An	87 / M	classical MCL	-	LN	<b>ATM</b> : c.8654T>G, p.Leu2885Arg, (VAF: 32%); <b>SMARCA4</b> : c.3554A>T, p.Gln1185Leu, (VAF: 23%)
9	CHA Ma	73 / F	classical MCL	-	LN	<b>ATM</b> : c.4757delG, p.Gly1586AspfsTer15, (VAF: 50%); <b>WHSC1</b> : c.3295G>A, p.Glu1099Lys, (VAF: 10%); <b>WHSC1</b> : c.3448A>G, p.Thr1150Ala, (VAF: 17%)
10	BIR Ca	59 / M	classical MCL	-	LN	<b>ATM</b> : c.6188G>A, p.Gly2063Glu, (VAF: 75%); <b>CDK4</b> : c.905C>T, p.Pro302Leu, (VAF: 34%)
11	BER Ra*	58 / m	classical MCL	R-VAD / ASCT	LN**	<b>ATM</b> : c.5751A>T, p.Arg1917Ser, (VAF: 63%)
12	BRO Da	54 / M	classical MCL	-	LN	<b>ATM</b> : c.4299T>A, p.Tyr1433Ter, (VAF: 8%); <b>ATM</b> : c.8341G>T, p.Val2781Phe, (VAF: 17%); <b>ATM</b> : c.9151G>C, p.Gly3051Arg, (VAF: 54%)
13	BON Je	67 / M	classical MCL	-	LN	<b>MLL3</b> : c.10763C>T, p.Ser3588Leu, (VAF: 48%); <b>UBR5</b> : c.8187+1delG, (VAF: 37%)
14	GIV Ma	86 / M	pleomorphic MCL	-	spleen	<b>CCND1</b> : c.105_106delGAGinsAA, p.Glu36Lys, (VAF: 40%); <b>TP53</b> : c.826_827delGCinsTT, p.Ala276Phe, (VAF: 67%)
15	ADI Kh	61 / M	classical MCL	R-FC	PB**	<b>TP53</b> : c.524G>A, p.Arg175His, (VAF: 88%)
16	VER PI	75 / M	classical MCL	Splenectomy	spleen	<b>CCND1</b> : c.140G>C, p.Cys47Ser, (VAF: 45%); <b>CHD2</b> : c.2657A>T, p.Asp886Val, (VAF: 7%); <b>RB1</b> : c.2133A>G, p.Ile711Met, (VAF: 7%)
17	GOL Mi	66 / F	classical MCL	-	LN	<b>LUZP4</b> : c.791G>A, p.Arg264Lys, (VAF: 14%); <b>UBR5</b> : c.8187+2_8187+3insTTTT, (VAF: 40%); <b>ZNF296</b> : c.482G>A, p.Arg161His, (VAF: 52%)
18	BOC Ja	57 / M	blastoid MCL	R-DHAP/ASCT	LN	<b>KLF2</b> : c.860C>T, p.Ser287Leu, (VAF: 58%); <b>RB1</b> : c.2133A>G, p.Ile711Met, (VAF: 7%)
19	FRA MI*	52 / M	classical MCL	R-VAD / ASCT	spleen**	<b>TRAF3</b> : p.Asn517GlnfsTer33, (VAF: 19%)
20	BAC Re	70 / M	classical MCL	-	LN	<b>none</b>
21	REY Je	66 / M	classical MCL	R-DHAP/ASCT	LN	<b>none</b>
22	FES Ge	65 / M	In situ MCL	WW / Rituximab	LN**	<b>TP53</b> : c.824G>T, p.Cys275Phe, (VAF: 20%)
23	BID LO	74 / M	classical MCL	RIBVD	PB	<b>TP53</b> : c.581T>G, p.Leu194Arg, (VAF: 97%); <b>MAF3K14</b> : c.2168G>A, p.Ser723Asn, (VAF: 49%)
24	LEV Fr*	65 / F	classical MCL	RIBVD	PB**	<b>TP53</b> : c.890G>A, p.Arg280Lys, (VAF: 34%); <b>MEF2B</b> : c.68A>G, p.Lys23Arg, (VAF: 50%); <b>MLL2</b> : c.9877C>T, p.Gln3293Ter, (VAF: 29%)
25	LOR MA	81 / M	pleomorphic MCL	RIBVD	PB	<b>ATM</b> : c.1118C>G, p.Thr373Arg, (VAF: 48%);
26	BEN MA	74 / M	classical MCL	RIBVD	PB	<b>TE12</b> : c.4946A>G, p.Tyr1649Cys, (VAF: 46%)
27	GUI MT	72 / F	classical MCL	RIBVD	PB	<b>none</b>
28	JAR BE	69 / F	classical MCL	RIBVD	PB	<b>none</b>
29	JAR CH	77 / M	classical MCL	RIBVD	PB	<b>TLR2</b> : c.28_33delGTCTTinsTCT, p.Val10_Leu11delInsSer, (VAF: 23%)
30	ORT SE	70 / M	classical MCL	RIBVD	PB	<b>none</b>

\*Patients for whom longitudinal followup by NGS was performed during salvage therapy

\*\* Additional sequencing performed in relapse / followup samples for the following patients as indicated: BER Ra: (LN), ADI Kh: (spleen), FRA Mi: (BM, PB), FES Ge: (LN), LEV Fr: (spleen, PB, PB & BM, PB, PB)

**Table S3 : Custom panel gene list**

Gene name	Reference transcript	Somatic variation(s) reported in this study
<i>ATM</i>	NM_000051.3	x
<i>ATP11C</i>	NM_173694.4	
<i>BIRC2</i>	NM_001166.4	
<i>BIRC3</i>	NM_001165.4	x
<i>BTK</i>	NM_000061.2	
<i>CCND1</i>	NM_053056.2	x
<i>CDH8</i>	NM_001796.4	
<i>CDK4</i>	NM_000075.3	x
<i>CDKN2A</i>	NM_000077.4	
<i>CHD2</i>	NM_001271.3	x
<i>CTNNA2</i>	NM_004389.1	
<i>DCP1B</i>	NM_152640.3	
<i>DLC1</i>	NM_182643.2	
<i>EIF2AK4</i>	NM_001013703	
<i>ESX1</i>	NM_153448.3	
<i>ETS1</i>	NM_005238.3	
<i>FAT4</i>	NM_024582	x
<i>FBXO25</i>	NM_183421.1	
<i>HAX1</i>	NM_006118.3	
<i>IHH</i>	NM_002181.3	
<i>KLF2</i>	NM_016270.2	x
<i>LUZP4</i>	NM_016383.4	x
<i>MAP3K14</i>	NM_003954.4	x
<i>MED18</i>	NM_017638.2	
<i>MEF2B</i>	NM_001145785.1	x
<i>MLL2</i>	NM_003482.3	x
<i>MLL3</i>	NM_170606.2	x
<i>MYD88</i>	NM_002468	
<i>OGDHL</i>	NM_018245.2	
<i>POT1</i>	NM_015450.2	
<i>RB1</i>	NM_000321.2	x
<i>SALL3</i>	NM_171999.3	
<i>SF3B1</i>	NM_012433.2	
<i>SLIT2</i>	NM_004787.2	
<i>SMARCA4</i>	NM_001128845.1	x
<i>SP140</i>	NM_007237.4	
<i>TET2</i>	NM_001127208.2	x
<i>TLR2</i>	NM_003264.3	x
<i>TNFAIP3</i>	NM_006290.3	
<i>TP53</i>	NM_000546.5	x
<i>TRAF2</i>	NM_021138.3	
<i>TRAF3</i>	NM_145725	x
<i>UBR5</i>	NM_015902.5	x
<i>WHSC1</i>	NM_133330.2	x
<i>ZNF117</i>	NM_015852.3	
<i>ZNF296</i>	NM_145288.1	x
<i>ZNF784</i>	NM_203374.1	

RIBVD cases

**THÈSE SOUTENUE PAR** : Arnaud GAUTHIER

**TITRE : LE SEQUENÇAGE « NOUVELLE GENERATION » A HAUT DEBIT CIBLE ; INTERET DANS LA PRISE EN CHARGE DES LYMPHOMES A CELLULES DU MANTEAU**

**CONCLUSION :**

L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer la faisabilité et l'utilité clinique d'un outil de séquençage ciblé à haut débit à travers un panel personnalisé de 44 gènes d'intérêt pour le lymphome à cellules du manteau (MCL) ainsi que 3 gènes choisis pour leurs potentiels dans le diagnostic différentiel tels que *MYD88* (maladie de Waldenström) et *SF3B1* (leucémie lymphoïde chronique) ainsi que *BTK* pour son rôle dans la résistance au traitement de l'Ibrutinib<sup>37</sup>.

Après s'être assuré de la faisabilité du projet via le séquençage de six lignées cellulaires ainsi que de 30 patients atteints de lymphome à cellules du manteau objectivant des fréquences de mutation similaires à celles décrites par les études pan-génomiques (Whole Exome Sequencing), nous avons noté que les gènes *ATM* et *TP53* sont les plus fréquemment mutés dans notre série (respectivement 54% et 13%). Ces deux gènes, facteurs pronostiques péjoratifs dans diverses hémopathies malignes et jouant un rôle majeur dans la réparation de l'ADN, sont fréquemment mutés dans les lymphomes à cellules du manteau et sont associés à des résistances thérapeutiques. Notre étude a montré, pour la première fois, un lien entre la présence de mutation *TP53* (*domaine de liaison à l'ADN*) et une résistance primaire chez des patients inclus dans le protocole prospectif national RiBVD (Rituximab, Bendamustine, Velcade, Dexaméthasone) incluant un inhibiteur du protéasome et dans une autre mesure, l'implication de *TP53* muté chez des patients en rechutes après auto ou allogreffe. Il paraît donc pertinent de proposer l'analyse du profil mutationnel de *TP53* au moment du diagnostic dans un but théranostique afin de proposer des alternatives thérapeutiques à ces patients mutés, à l'instar des stratégies faisant appel aux mécanismes de létalité synthétique développées dans les tumeurs

solides avec les inhibiteurs de PARP. En effet, la combinaison des profils d'expression génique au score de mutation peut offrir des perspectives sur les mécanismes de résistance. Ici, les données obtenues évoquent un lien avec un échappement à la surveillance immunitaire ainsi qu'avec une signature « cellules souches » de la voie de signalisation MYC. Ces deux hypothèses/pistes thérapeutiques potentiellement intéressantes chez les patients *TP53* mutés, suggèrent un intérêt pour les inhibiteurs de la voie MYC comme les inhibiteurs de BET le sont pour la voie NFκB<sup>38</sup>; cependant cela nécessite d'être approfondi, au moins pré-cliniquement.

Outre les mutations *TP53*, des mutations au sein de gènes codant pour des régulateurs épigénétiques ont été identifiées chez neuf patients (9/30): gènes *MLL2* et *MLL3* (histones méthyltransférases), *SMARCA4* (régulateur SWI/SNF), *UBR5*, *WHSC1* et *CHD2* (régulateurs chromatinien)<sup>39</sup>. Chez les patients ayant montré une résistance au schéma RiBVD, les mutations *TP53* sont d'ailleurs associées à des mutations de *MEF2B* et *MLL2* ou encore à des mutations du gène *MAP3K14*, récemment identifié comme un acteur potentiellement impliqué dans la résistance aux thérapies inhibitrices de la voie de signalisation issue du BCR telles que l'Ibrutinib. De plus, il est à noter que le gène *CHD2*, muté dans les leucémies lymphoïdes chroniques, a été retrouvé muté dans un cas de notre série. Il a été décrit que des mutants murins hétérozygotes pour *CHD2* présentent des hyperplasies lymphoïdes et meurent de lymphomes multiples, supportant l'idée que ce gène serait impliqué dans le développement des hémopathies lymphoïdes malignes incluant le lymphome à cellules du manteau<sup>40,41</sup>. Le lymphome à cellule du manteau pourrait ainsi être qualifié de maladie épigénétique, eut égard à la fréquence des mutations de régulateurs épigénétiques et des modifications fréquentes de certaines marques d'histones comme la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (étudiée par notre équipe).

D'autre part, ce projet avait également pour ambition de comprendre l'évolution sous clonale de la maladie à travers une étude longitudinale approfondie chez trois patients pour lesquels nous disposions de 2 à 5 échantillons tumoraux s'étalant sur plusieurs années. Ces études

longitudinales peuvent apporter des éléments nécessaires à la compréhension de «l'orchestration» tumorale en permettant d'identifier d'éventuelles mutations génétiques à l'origine de la sélection d'un ou plusieurs sous-clones tumoraux impliqués dans la rechute/évolution, ou bien de modifier un équilibre dynamique entre les sous-clones et leur environnement et ainsi façonner leur évolution. Cette capacité à identifier les altérations génétiques décisives, notamment avant l'apparition d'une complexité génétique sont des enjeux de l'onco-hématologie moderne.

Cette stratification du paysage mutationnel des patients atteints de MCL conduit également, pour la prise en charge des patients, vers une approche globale basée sur un score de risque associant paramètres cliniques et génétiques, incluant les mutations de gènes clés. Dans le lymphome folliculaire, il existe déjà un tel modèle de risque appelé le m7-FLIPI basé sur le statut mutationnel de 7 gènes (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP* et *CARD11*)<sup>42</sup>. Le design d'algorithmes moléculaires similaires incorporant si possible des signatures géniques apparaît important et nécessaire mais s'avère être un défi à relever étant donné la faible fréquence mutationnelle des gènes associés au lymphome du manteau.

**VU ET PERMIS D'IMPRIMER**  
Grenoble, le : 10. 04 . 2018

**LE DOYEN**

  
Pr. Patrice MORAND  
Le Doyen de l'Université de Médecine

**LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE**

  
Pr. Dominique LEROUX

## Bibliographie

1. Campo, E. *et al.* The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* **117**, 5019–5032 (2011).
2. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–2390 (2016).
3. Smedby, K. E. & Hjalgrim, H. Epidemiology and etiology of mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Semin. Cancer Biol.* **21**, 293–298 (2011).
4. RESERVES, I. U.--T. D. Orphanet: Lymphome à cellules du manteau. Available at: [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=FR&Expert=52416](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=52416). (Accessed: 10th July 2017)
5. Gru, A. A. *et al.* Cutaneous mantle cell lymphoma: a clinicopathologic review of 10 cases. *J. Cutan. Pathol.* **43**, 1112–1120 (2016).
6. Carvajal-Cuenca, A. *et al.* In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica* **97**, 270–278 (2012).
7. Taverna, J. *et al.* A rare presentation of in situ mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: a case report and review of the literature. *Case Rep. Hematol.* **2014**, 145129 (2014).
8. Sloan, C., Xiong, Q.-B., Crivaro, A., Steinman, S. & Bagg, A. Multifocal mantle cell lymphoma in situ in the setting of a composite lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **143**, 274–282; quiz 307 (2015).
9. Tiemann, M. *et al.* Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br. J. Haematol.* **131**, 29–38 (2005).
10. Bertoni, F. & Ponzoni, M. The cellular origin of mantle cell lymphoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1747–1753 (2007).

11. Jares, P., Colomer, D. & Campo, E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 750–762 (2007).
12. Liu, Z. *et al.* CD5- mantle cell lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **118**, 216–224 (2002).
13. Monteil, M., Callanan, M., Dascalescu, C., Sotto, J. J. & Leroux, D. Molecular diagnosis of t(11;14) in mantle cell lymphoma using two-colour interphase fluorescence in situ hybridization. *Br. J. Haematol.* **93**, 656–660 (1996).
14. Salaverria, I. *et al.* CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* **121**, 1394–1402 (2013).
15. van Dongen, J. J. M. *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* **17**, 2257–2317 (2003).
16. Flordal Thelander, E. *et al.* Detailed assessment of copy number alterations revealing homozygous deletions in 1p and 13q in mantle cell lymphoma. *Leuk. Res.* **31**, 1219–1230 (2007).
17. Hartmann, E. M. *et al.* Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling. *Blood* **116**, 953–961 (2010).
18. Gimenez, E. *et al.* Cloned IGH VDJ targets as tools for personalized minimal residual disease monitoring in mature lymphoid malignancies; a feasibility study in mantle cell lymphoma by the Groupe Ouest Est d'Etude des Leucémies et Autres Maladies du Sang. *Br. J. Haematol.* **158**, 186–197 (2012).
19. Jaspers, A. *et al.* [Mantle cell lymphoma]. *Rev. Med. Liege* **65**, 171–176 (2010).
20. Narurkar, R., Alkayem, M. & Liu, D. SOX11 is a biomarker for cyclin D1-negative mantle cell lymphoma. *Biomark. Res.* **4**, 6 (2016).

21. Mozos, A. *et al.* SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* **94**, 1555–1562 (2009).
22. Lord, M., Wasik, A. M., Christensson, B. & Sander, B. The utility of mRNA analysis in defining SOX11 expression levels in mantle cell lymphoma and reactive lymph nodes. *Haematologica* **100**, e369–e372 (2015).
23. Fu, K. *et al.* Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* **106**, 4315–4321 (2005).
24. Beà, S. *et al.* Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 18250–18255 (2013).
25. Meissner, B. *et al.* The E3 ubiquitin ligase UBR5 is recurrently mutated in mantle cell lymphoma. *Blood* **121**, 3161–3164 (2013).
26. Kridel, R. *et al.* Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood* **119**, 1963–1971 (2012).
27. Zhang, J. *et al.* The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells. *Blood* **123**, 2988–2996 (2014).
28. Rahal, R. *et al.* Pharmacological and genomic profiling identifies NF- $\kappa$ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat. Med.* **20**, 87–92 (2014).
29. Rossi, D. *et al.* A Molecular Model for the Prediction of Progression Free Survival in Young Mantle Cell Lymphoma Patients Treated with Cytarabine-Based High Dose Sequential Chemotherapy and Autologous Stem Cell Transplantation: Results from the MCL0208 Phase III Trial from Fondazione Italiana Linfomi (FIL). *Blood* **126**, 336–336 (2015).
30. Queirós, A. C. *et al.* Decoding the DNA Methylome of Mantle Cell Lymphoma in the Light of the Entire B Cell Lineage. *Cancer Cell* **30**, 806–821 (2016).

31. Hoster, E. *et al.* A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* **111**, 558–565 (2008).
32. Hoster, E. *et al.* Confirmation of the mantle-cell lymphoma International Prognostic Index in randomized trials of the European Mantle-Cell Lymphoma Network. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 1338–1346 (2014).
33. Martin, P. *et al.* Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 1209–1213 (2009).
34. Vose, J. M. Mantle cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *Am. J. Hematol.* **92**, 806–813 (2017).
35. Le Gouill, S. *et al.* Rituximab after Autologous Stem-Cell Transplantation in Mantle-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1250–1260 (2017).
36. Wang, M. L. *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 507–516 (2013).
37. Raedler, L. Velcade (Bortezomib) Receives 2 New FDA Indications: For Retreatment of Patients with Multiple Myeloma and for First-Line Treatment of Patients with Mantle-Cell Lymphoma. *Am. Health Drug Benefits* **8**, 135–140 (2015).
38. Chiron, D. *et al.* Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer Discov.* **4**, 1022–1035 (2014).
39. Hajmirza, A. *et al.* BET Family Protein BRD4: An Emerging Actor in NFκB Signaling in Inflammation and Cancer. *Biomedicines* **6**, (2018).
40. Dawson, M. A. The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities. *Science* **355**, 1147–1152 (2017).
41. Nagarajan, P. *et al.* Role of chromodomain helicase DNA-binding protein 2 in DNA damage response signaling and tumorigenesis. *Oncogene* **28**, 1053–1062 (2009).

42. Shanmugam, M. K. *et al.* Role of novel histone modifications in cancer. *Oncotarget* **9**, 11414–11426 (2017).
43. Pastore, A. *et al.* Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol.* **16**, 1111–1122 (2015).